

CHRISTIANE ELIZA MOTTA DUARTE

**IDENTIFICAÇÃO DO SÍTIO FRA(X) POR TÉCNICAS CITOGENÉTICAS COM O  
USO DE ANTAGONISTAS E DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

D812i  
2012

Duarte, Christiane Eliza Motta, 1986-  
Identificação do sítio fra(X) por técnicas citogenéticas com  
o uso de antagonistas e diferentes meios de cultura /  
Christiane Eliza Motta Duarte. – Viçosa, MG, 2012.  
xi, 41f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 31-39

1. Citogenética humana. 2. Síndrome de fragilidade do  
cromossomo X. 3. Linfócitos. 4. Fluorodeoxiuridina.  
5. Metotrexato. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22. ed. 572.8

CHRISTIANE ELIZA MOTTA DUARTE

**IDENTIFICAÇÃO DO SÍTIO FRA(X) POR TÉCNICAS CITOGENÉTICAS COM O  
USO DE ANTAGONISTAS E DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de julho de 2012




---

Vanner Boere Souza



---

Wellington Ronildo Clarindo  
(Coorientador)



---

Carlos Roberto de Carvalho  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pelo suporte técnico e científico e pelo ensino de qualidade sem o qual a execução desse projeto não seria possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa pelo apoio financeiro.

Ao professor Carlos Roberto pela orientação e conselhos, um exemplo marcante de ética e profissionalismo e, principalmente, de paixão por aquilo que faz. Aos professores participantes da banca Wellington Ronildo e Vanner Boere pela colaboração e a todos os professores e funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Citogenética e Citometria pelo convívio harmonioso e trabalho em equipe: Wellington Clarindo, Milene Fontes, Isabella Santiago, Thaís Ribeiro, Guilherme Mendes, Fernanda Ferrari, Evandro Pianissola, Maria Andréia Mendonça, Andréa Koehler e Sirlei Julião. Aos técnicos José Francisco e Ana Paula Toma.

A meus pais Liliam da Conceição Motta e Eduardo Gomes Duarte, meu irmão Marcus Eduardo Motta Duarte, minha tia Ladir Piedade Motta e minha prima Letícia Caroline Motta Duarte e a todos os meus familiares, pelo amor incondicional e por apoiar-me sempre na busca pela realização dos meus sonhos. A eles devo grande parte dessa conquista.

Ao meu companheiro Carlos José Ferreira Lopes por estar ao meu lado nas horas mais difíceis. No decorrer desses dois anos você esteve presente e foi meu porto seguro, seu amor e incentivo revigoraram as minhas forças ajudando-me a não desistir jamais. Obrigada pela compreensão e apoio e por acreditar no meu potencial.

Agradeço também aos meus amigos e colegas de curso. Em especial Iara Calil, por ser um ombro amigo disponível em todas as horas, Lucas Lopes pelo companheirismo e incentivo, David Dutra e Juliana Benevenuto, amigos que conquistei durante a graduação e que sempre me apoiaram. Aos amigos do *kickboxing* pelo carinho e pela força nos bons e maus momentos e por tornarem minha permanência em Viçosa bem mais divertida. Com eles aprendi a ver a vida literalmente com outros olhos.

Agradeço sobretudo a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. O Senhor me deu forças e motivação para não perder o alvo e desistir de meus objetivos. A Ele dedico esse trabalho, “por que Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas”.

*“Entrega ao Senhor as tuas obras  
e teus desígnios serão estabelecidos”*

*Provérbios 16:3*

## **BIOGRAFIA**

**CHRISTIANE ELIZA MOTTA DUARTE**, filha de Eduardo Gomes Duarte e Liliam da Conceição Motta, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, no dia 12 de janeiro de 1986.

Em 2006, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, bacharelando-se em julho de 2010, ocasião em que foi agraciada com a medalha de ouro Presidente Bernardes.

Durante o período de graduação foi bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET/Biologia). Exerceu atividades de monitoria nos Departamentos de Biologia Animal e Geral e foi bolsista do PIBIC/CNPq no Laboratório de Citogenética e Citometria, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética Humana e Citometria de Imagem.

Em agosto de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de mestrado, em Genética e Melhoramento, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2012.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
RESUMO .....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Aspectos gerais dos sítios frágeis .....	3
2.2 Síndrome do X frágil.....	4
2.2.1 Descoberta e epidemiologia .....	5
2.2.2 Bases moleculares da síndrome.....	6
2.2.3 Padrão de herança .....	8
2.2.4 Características clínicas .....	9
2.2.5 Diagnóstico.....	10
2.3 Citogenética do X frágil.....	12
2.3.1 Expressão citogenética dos sítios frágeis com o uso de antagonistas .....	13
3 OBJETIVOS .....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1 Delineamento experimental.....	17
4.2 Estudo citogenético .....	17
4.2.1 Grupo amostral.....	17
4.2.2 Coleta de sangue.....	17
4.2.3 Cultura do material citogenético.....	18
4.2.4 Coleta dos linfócitos, bloqueio e hipotonização.....	19
4.2.5 Preparo das lâminas.....	19
4.2.6 Coloração sólida e bandeamento G.....	19
4.2.7 Análise dos dados .....	20

5	RESULTADOS .....	21
5.1	Média de metáfases por lâmina .....	21
5.2	Montagem do cariótipo .....	22
5.3	Expressão de fra(X) .....	25
5.4	Heredograma.....	26
6	DISCUSSÃO.....	27
7	CONCLUSÕES .....	30
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
	ANEXOS.....	40



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Via simplificada do metabolismo do folato evidenciando os pontos de atuação dos principais antagonistas utilizados para elucidar FRAXA. Mtx, metotrexato; FUdR, fluorodeoxiuridina; FCdR, fluorodeoxicidina; DHFR, dihidrofolato redutase; THF, tetraidrofolato; DHF, dihidrofolato; TS, timidilato sintetase; dUMP, desoxiuridina monofosfato; dTMP desoxitimidina monofosfato..... 14
- Figura 2 – Histograma mostrando o número médio de metáfases por lâmina para os dois irmãos observado nas culturas com metotrexato (Mtx),  $\bar{x} = 8,7 \pm 1,15$ , fluorodeoxiuridina (FUdR),  $\bar{x} = 23,7 \pm 3,21$ , e sem antagonista  $\bar{x} = 42 \pm 2,64$ . Notar que nas culturas com antagonista há uma redução em média de 45,38% no percentual de metáfases quando se utiliza FUdR e 80,5% quando o antagonista é Mtx..... 21
- Figura 3 – Cariogramas do irmão 1 com  $2n = 46, Y, fra(X)(q27.3)$  obtidos a partir de culturas tratadas com 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de FUdR. O sítio fra(X) é visualizado como uma região descontínua na porção terminal do braço longo do cromossomo X. a) coloração sólida com Giemsa 5%. b) Bandeamento GTG. Barra = 10 $\mu\text{m}$ ..... 23
- Figura 4 – Cariogramas do irmão 2 com  $2n = 46, Y, fra(X)(q27.3)$  obtidos a partir de culturas tratadas com 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de FUdR. O sítio fra(X) é visualizado como uma região descontínua na porção terminal do braço longo do cromossomo X. a) coloração sólida com Giemsa 5%. b) Bandeamento GTG. Barra = 10 $\mu\text{m}$ ..... 24
- Figura 5 – Amostra de cromossomos fra(X) ampliados do irmão 1 obtidos a partir de culturas tratadas com 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de FUdR. Coloração sólida com Giemsa 5%. Barra = 10 $\mu\text{m}$ ..... 25
- Figura 6 – Amostra de cromossomos fra(X) ampliados do irmão 2 obtidos a partir de culturas tratadas com 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de FUdR. Coloração sólida com Giemsa 5%. Barra = 10 $\mu\text{m}$ ..... 25
- Figura 7 – Heredograma da família participante desse estudo. II-1 e II-3 apresentam cromossomo fra(X). A mãe (I-1) é portadora da pré-mutação. A filha (II-2) é normal, mas tem 50% de chance de também ser portadora, o que é indicado por um símbolo com interrogação. Os símbolos totalmente preenchidos em preto correspondem aos indivíduos afetados, enquanto o círculo com marcação central representa portador da pré-mutação..... 26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos sítios frágeis.....	3
Tabela 2 – Sistemas de cultura para identificação do sítio frágil Xq27.3.....	13
Tabela 3 – Distribuição dos tratamentos com antagonistas por meio de cultura utilizado.....	18
Tabela 4 – Análise de variância das médias de metáfases obtidas nos ensaios com os meios de cultura RPMI 1640, LymphoGrow e PB-MAX em combinação com o antagonista FUdR.....	22
Tabela 5 – Análise de variância das médias de metáfases obtidas nos ensaios com os meios de cultura RPMI 1640, LymphoGrow e PB-MAX em combinação com o antagonista Mtx..	22
Tabela 6 – Porcentagem de expressão de fra(X) nos diferentes meios de cultura utilizados em combinação com Mtx e FUdR.....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics
BrdU	Bromodeoxiuridina
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato redutase
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
FBS	Soro bovino fetal
FCdR	Fluorodeoxicidina
FMR1	<i>Fragile X Mental Retardation 1</i>
FMRP	<i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>
FRA11B	Sítio frágil localizado na região 11q23 do cromossomo 11
FRAXA	Sítio frágil localizado na região Xq27.3 do cromossomo X
fra(X)	Sítio frágil, sinônimo de FRAXA
FRAXB	Sítio frágil localizado na região Xp22.31 do cromossomo X
FRAXC	Sítio frágil localizado na região Xq22.1 do cromossomo X
FRAXD	Sítio frágil localizado na região Xq27.2 do cromossomo X
FRAXE	Sítio frágil localizado na região Xq28 do cromossomo X
FRAXF	Sítio frágil localizado na região Xq28 do cromossomo X
FUdR	Fluorodeoxiuridina
FXS	<i>Fragile X Syndrome</i>
FXTAS	<i>Fragile X-associated Tremor/ataxia Syndrome</i>
<i>g</i>	Força centrífuga
G <sub>2</sub>	Fase de intervalo 2 do ciclo celular

GTG	<i>G-bands by trypsin using Giemsa</i>
kb	1x10 <sup>3</sup> pares de bases
min	Minuto
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
Mtx	Metotrexato
NTM	<i>normal transmitting male</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
S	Fase de síntese celular
S <sub>3</sub>	Subfase 3 da fase S
S <sub>4</sub>	Subfase 4 da fase S
THF	Tetrahidrofolato
TS	Timidilato sintase
UTR	Região não-traduzida
WHO	<i>World Health Organization</i>

## RESUMO

DUARTE, Christiane Eliza Motta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Identificação do sítio fra(X) por técnicas citogenéticas com o uso de antagonistas e diferentes meios de cultura.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Coorientadores: Sérgio Oliveira de Paula e Wellington Ronildo Clarindo.

A Síndrome do X frágil é a principal causa de retardo mental hereditário com prevalência estimada de 1 em cada 3600 homens e 1 em cada 4000 a 6000 mulheres. Essa síndrome provoca comprometimento intelectual e social moderado a severo, associado com características como cabeça e orelhas grandes, rosto alongado e macroorquidismo. A causa mais frequente dessa desordem é a expansão do trinucleotídeo CGG localizado na região 5' UT do gene FMR-1, em Xq27.3. Esse loco corresponde a um sítio frágil que pode ser visualizado em cromossomos metafásicos sob condições seletivas de cultura. Neste estudo analisamos dois irmãos com indicativo clínico da Síndrome do X frágil. Linfócitos oriundos de sangue periférico foram avaliados após 96 h de cultura a 37°C em meio RPMI 1640 (suplementado com 5% de FBS, 20 mM de HEPES, 2 mM de glutamina e 1% M-PHA), LymphoGrow<sup>®</sup> e PB-MAX<sup>®</sup>. Para as culturas com antagonista, dois tubos de cada meio disponível foram preparados, e em cada um, 0,25 µg/mL de fluorodeoxiuridina (FUdR) ou 8 µg/mL de metotrexato (Mtx) foram adicionados 72 h após o início da cultura. As culturas foram colhidas após 95 h e 45 min utilizando-se métodos de rotina, após exposição a 0,1 µg/mL de colcemide durante 15 min. As lâminas foram coradas com Giemsa 5% para rastreamento de cromossomos fra(X), e a técnica de bandeamento G foi empregada para a confirmação do sítio frágil na região Xq27.3. Os linfócitos cultivados nos meios RPMI 1640, LymphoGrow e PB-MAX responderam de forma equivalente à adição dos antagonistas. Não houve diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade entre o número médio de metáfases observado nos três meios em combinação com FUdR. Do mesmo modo, nos três meios o tratamento com metotrexato foi muito tóxico e resultou em número insuficiente de células analisáveis. Nessas culturas com Mtx não foram detectados cromossomos fra(X). Um total de 208 metáfases para irmão 1 e 205 para o irmão 2 foram analisadas, das quais 21% e 20%, respectivamente, foram positivas para X frágil. Esses dados estão de acordo com a estimativa de expressão em homens afetados que varia de 10-40% e corroboram com os de outros estudos que reportaram que homens da mesma família tendem a apresentar frequências similares de fra(X). Os procedimentos para a indução de sítio frágil e análise citogenética mostraram-se adequados para identificação de FRAXA nos irmãos analisados com indicativo clínico da Síndrome do X frágil.

## ABSTRACT

DUARTE, Christiane Eliza Motta, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Fra(X) site identification by cytogenetic techniques using antagonists and different culture mediums**. Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Co-advisers: Sérgio Oliveira de Paula and Wellington Ronildo Clarindo.

Fragile X syndrome is the most common inherited cause of intellectual disability with an estimated prevalence of 1 in 3600 males and 1 in 4000 to 6000 females, where it causes moderate to severe intellectual and social impairment together with syndromic features including large ears and head, long face and macroorchidism. It is most often is caused by expansion of a CGG trinucleotide repeat array in the 5' UT region of the FMR-1 gene at Xq27.3. This locus corresponds to a fragile site which can be observed in the metaphase chromosome following selective culture conditions. In this study we analyze two brothers with clinical indicative of fragile X syndrome. Peripheral blood lymphocytes were studied after 96 hrs culture periods at 37°C in RPMI 1640 (supplemented with 5% fetal serum bovine, 20 mM HEPES, 2mM glutamine and 1% M-PHA), LymphoGrow<sup>®</sup> and PB-MAX<sup>®</sup>. Two bottles for each medium was prepared for cultures with antagonists, and in each one 0,25 µg/mL fluorodeoxyuridine (FUdR) or 8 µg/mL methotrexate (Mtx) were added 72 hrs after the start of culture. Cultures were harvested after 95 hrs and 45 minutes using standard methods following exposure to 0,1 µg/mL colcemid for 15 minutes. Slides were stained with Giemsa 5% for fra(X) screening and G banding was employed for confirmation of the Xq27.3 fragile site. Lymphocytes growing in RPMI 1640, LymphoGrow and PB-MAX responded equivalently to the addition of antagonists. According to the F test at the level of 5% probability, there were no significant differences between the average number of metaphases in the three mediums in combination with FUdR. Similarly, in the three mediums methotrexate treatment was very toxic and resulted in insufficient number of analyzable cells. No fra(X) were detected in the cultures with this treatment. A total of 208 metaphases for brother 1 and 205 for brother 2 were scanned of which 21% and 20%, respectively, were positive for fra(X). These results of fragile X expression in brothers are in agreement with the estimate expression in affected males ranging from 10-40% and corroborate those of other studies which reported that men of the same family tend to have similar frequencies of fra(X). The procedures for induction of fragile site and cytogenetic analysis showed to be adequate in order to identify the presence of FRAXA in the analyzed brothers with clinical suspicion of fragile X syndrome.

## 1 INTRODUÇÃO

Cerca de 2% da população é afetada por alguma forma de comprometimento cognitivo (ROUSSEAU *et al.*, 2011) e apresenta limitações em duas ou mais das seguintes habilidades adaptativas: comunicação e linguagem, cuidado pessoal, segurança e saúde, capacidade de aprendizagem e habilidades sociais (BEIRNE-SMITH *et al.*, 1994). Fatores genéticos têm sido associados a 25-50% dos casos de inabilidade intelectual (SUTHERLAND & MULLEY, 1997; CURRY *et al.*, 1997). Alterações cromossômicas foram correlacionadas a essa condição em diferentes estudos (THAPAR *et al.*, 1994; CURRY *et al.*, 1997; BHASIN, 2005). Análises citogenéticas de rotina têm mostrado que 40% do retardo mental severo e 10-20% do retardo leve são de origem cromossômica (FLINT *et al.*, 1995).

Alterações no cromossomo X frequentemente estão associadas à ocorrência de retardo mental, justificando pelo menos em parte a maior incidência dessa condição em indivíduos do sexo masculino (LEHRKE, 1972). A Síndrome do X frágil é a forma mais prevalente de retardo ligado ao X, representando cerca de 20% de todos os casos de retardo mental herdado (FISHBURN *et al.*, 1983; GARBER *et al.*, 2008; ROUSSEAU *et al.*, 2011). Esse distúrbio caracteriza-se pela presença de uma constrição no final do braço longo do cromossomo X (LUBS, 1969). Essa região denominada sítio frágil é um loco que apresenta instabilidade cromossômica, visualizado como quebra ou falha nos cromossomos metafásicos e que é evidenciada em condições especiais de cultura, como deficiência de ácido fólico ou excesso de timidina (SUTHERLAND, 1979; VERMA e BABU, 1995; BARCH *et al.*, 1997).

As características fenotípicas mais marcantes dessa síndrome são: i) rosto estreito e alongado; ii) testa alta; iii) maxilar inferior proeminente; iv) orelhas grandes e salientes; v) macrorquidismo; vi) inabilidade intelectual leve a severa, frequentemente associada a comportamento semelhante a autismo e vii) atraso do desenvolvimento (GARBER *et al.*, 2008). Os indivíduos que apresentam tais características devem ser encaminhados para avaliação diagnóstica. Segundo a Organização Mundial de Saúde o diagnóstico da síndrome envolve a detecção de erros no gene responsável pela patologia. Dentre as metodologias utilizadas incluem-se análise citogenética e testes moleculares (*World Health Organization – WHO*, 2010).

A primeira etapa da análise citogenética, objeto desse estudo, é o estímulo da divisão celular (CARVALHO, 2006). Geralmente utiliza-se sangue periférico para realização das análises (DAVEN e SANGER, 2007) uma vez que propicia maior conforto ao paciente durante a coleta e menos risco à sua saúde, comparativamente ao uso de células de outros tecidos, como medula óssea e fibroblastos (CARVALHO, 2006). Para a análise de X frágil, os linfócitos

precisam ser cultivados em meios com baixa concentração de ácido fólico e timidina, ou em meios convencionais, nos quais são adicionados antagonistas desses compostos 24 h antes do término do período de cultura (SUTHERLAND, 1979). Depois de estimuladas, as células são submetidas a um tratamento com colcemide. Essa substância impede a formação das fibras do fuso, bloqueando o ciclo celular na metáfase, fase em que os cromossomos estão mais individualizados e condensados (MALUF *et al.*, 2011). Em etapa subsequente, as metáfases são espalhadas em lâminas de vidro e bandeadas por técnicas de coloração específicas em que os cromossomos apresentam um padrão de bandas claras e escuras típico de cada par (SUMNER, 1994; BARCH *et al.*, 1997). Segue-se a análise cariotípica com montagem do kariograma e identificação de eventuais alterações cromossômicas numéricas e estruturais, inclusive presença do sítio frágil.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais dos sítios frágeis

Sítios frágeis são locos que mostram instabilidade cromossômica e que são visualizados como quebras ou falhas nos cromossomos metafásicos após inibição parcial da síntese de DNA e falha da condensação da cromatina na mitose (HUSSEIN, 1998; FÉLIX, 2011). De acordo com Sutherland (1979) sítios frágeis são lesões acromáticas não-randômicas que se localizam em uma ou ambas as cromátides de um cromossomo e que estão presentes em somente uma porção das células analisadas. Quando expressos, sua localização no cromossomo é constante em todas as células de um indivíduo ou família. Esses sítios tendem a ser hereditários e segregar de forma Mendeliana co-dominante nas famílias.

Esses sítios podem ser subdivididos em duas classes: sítios raros e comuns. Os raros são expressos em menos que 5% da população e geralmente são causados por expansão de trinucleotídeos. Os sítios comuns por sua vez são observados em todos os indivíduos e fazem parte da estrutura cromossômica normal (SUTHERLAND, 1991; FÉLIX, 2011). Todos os sítios conhecidos são induzíveis, mesmo aqueles que são expressos espontaneamente e podem ser classificados de acordo com as condições de cultura sob as quais são expressos (SUTHERLAND, 1991). A tabela 1 apresenta a classificação dos sítios frágeis conhecidos bem como o modo de indução e o tipo de sequência que os caracteriza.

Tabela 1 – Classificação dos sítios frágeis

Classe	Número de locos	Sequência
<b>Sítios frágeis raros</b>	<b>31</b>	
Folato-sensíveis	24	(CGG) <sub>n</sub>
Induzidos por distamicina A	5	Rica em repetições AT
Induzidos por BrdU	2	Rica em repetições AT
<b>Sítios frágeis comuns</b>	<b>87</b>	
Induzidos por afidilcolina	76	Rica em AT
Induzidos por BrdU	7	Rica em AT
Induzidos por 5-azacitidina	4	Não caracterizada

Adaptada de Durkin e Glover (2007)

Em 1987 Laird *et al.* hipotetizaram que o sítio frágil era um região de duplicação tardia que não recebia uma sinalização adequada para o empacotamento da cromatina. Posteriormente Yu *et al.* (1990) e Webb (1992) verificaram por meio de estudos citogenéticos que a região

Xq27.3 apresentava de fato uma duplicação tardia. Em 1993 Hansen *et al.* demonstraram que em homens afetados essa região duplicava-se em G<sub>2</sub>/M, enquanto em homens normais e nos portadores do alelo pré-mutado a duplicação ocorria em S<sub>3</sub> e S<sub>4</sub>. A replicação tardia dessa região é parte do mecanismo que leva a formação de lacunas e constrições em cromossomos metafásicos de células cultivadas sob condições de estresse de replicação (OZERI-GALAI *et al.*, 2012). Essa característica dos sítios frágeis é especialmente evidente nos sítios raros que apresentam repetições AT e CGG. Essas repetições podem formar estruturas secundárias como grampo, triplex e tetraplex que inibem a forquilha de replicação. As falhas e quebras cromossômicas são resultado do DNA não replicado (ARLT *et al.*, 2006).

O sítio frágil fra(X)(q27.3) (FRAXA) foi o primeiro a ser relacionado a uma desordem com significado clínico estabelecido (LUBS, 1969). Além desse sítio outros cinco estão presentes no cromossomo X: fra(X)(p22.31) (FRAXB); fra(X)(q22.1) (FRAXC); fra(X)(q27.2) (FRAXD); fra(X)(q28) (FRAXE e FRAXF). Os três primeiros são sítios comuns induzíveis por afidilcolina e que não estão associados a um fenótipo clínico (JACKY, 1996). Já FRAXE e FRAXF são folato-sensíveis, os quais são citogeneticamente indistinguíveis de FRAXA (SUTHERLAND e BAKER, 1992; HIRST *et al.*, 1993). FRAXE tem sido relacionado a uma síndrome de retardo mental moderado não-específico enquanto a associação de FRAXF é controversa (HIRST *et al.*, 1993).

Outro sítio que tem sido associado a uma patologia é o sítio folato-sensível FRA11B, localizado no cromossomo 11q23. A deleção dessa região provoca a Síndrome de Jacobsen (JONES *et al.*, 1995). Estudos recentes têm proposto uma correlação entre sítios frágeis comuns e locais de ocorrência de quebras e rearranjos em células cancerosas, mas o papel desses sítios na oncogênese ainda é controverso (DEBACKER e KOOY, 2007; OZERI-GALAI *et al.*, 2012).

## 2.2 Síndrome do X frágil

O primeiro sítio frágil de significado clínico estabelecido foi o sítio raro FRAXA. Citogeneticamente, essa região corresponde a um sítio frágil no cromossomo X em Xq28.3 que se expressa como um região descontínua ou uma constrição e está associado com a forma mais comum de retardo mental herdado: a Síndrome do X frágil (LUBS, 1969; SUTHERLAND, 1977).

A Síndrome do X frágil (*Fragile X Syndrome* – FXS) [OMIM #300624] é a principal causa de retardo mental hereditário em todas as populações e grupos étnicos (CRAWFORD *et al.*, 2001; SHERMAN *et al.*, 2005). Constitui-se como a segunda causa específica genética de

deficiência mental depois da Síndrome de Down, entretanto, a Síndrome do X frágil tem alto risco de recorrência entre os irmãos dos afetados (HUSSEIN, 1998). Essa síndrome resulta de uma alteração no gene *Fragile X Mental Retardation 1* (FMR1) (VERKERK *et al.*, 1991; BARDONI *et al.*, 2000; JIN e WARREN, 2000). A mutação responsável por 99% dos casos é causada pela expansão progressiva do número de cópias de uma sequência instável de trinucleotídeos – CGG, localizada na região 5' não traduzida (UTR) do gene FMR1. Como consequência desse aumento, tem-se uma hipermetilação da região promotora e alteração da expressão gênica (YU *et al.*, 1991; SHERMAN *et al.*, 2005) que se expressa citogeneticamente como um sítio frágil (JACKY, 1997). Mutações de ponto ou deleções na sequência codificante de FMR1 também podem ocasionar a FXS, mas esse tipo de alteração ocorre em somente 1% dos casos (de BOULLE *et al.*, 1993; COFFEE *et al.*, 2008).

### **2.2.1 Descoberta e epidemiologia**

Em 1943, Martin e Bell foram os primeiros a descrever um estudo de família que apresentava 11 homens afetados por retardo mental, em duas gerações e que eram descendentes de mães normais. Tal padrão de segregação era sugestivo de herança ligada ao X, e essa condição clínica foi denominada Síndrome de Martin-Bell (MARTIN e BELL, 1943). Em 1969, Lubs identificou um marcador anormal no final do braço longo do cromossomo X, ao estudar uma família com indivíduos do sexo masculino com retardo mental e que também exibiam um padrão de herança ligada ao X. Somente na década de 70, Sutherland demonstrou que a expressão desse marcador anormal era dependente de baixas concentrações de ácido fólico no meio de cultura em que as células cresciam. Essas constrições ou regiões descontínuas visualizadas nos cromossomos foram denominadas sítios frágeis por apresentarem alta propensão a sofrerem quebras (SUTHERLAND, 1977) e em 1975, na conferência de Paris, esse sítio foi designado como fra(X) (PARIS CONFERENCE, 1975). Testes citogenéticos para detecção desse sítio tornaram-se disponíveis. Em 1981, Richards *et al.* realizaram uma avaliação citogenética da mesma família estudada por Martin e Bell (1943) e identificaram o sítio frágil no cromossomo X nos indivíduos afetados. Então a Síndrome de Martin-Bell passou a ser chamado de Síndrome do X frágil (MCCONKIE-ROSELL *et al.*, 2005).

Com o advento das técnicas de biologia molecular na década de 80, foi possível determinar a localização do gene responsável pelo X frágil, e por meio de estudos de análise de ligação, testes pré-natais acurados e de rastreamento de portadores assintomáticos puderam ser realizados em algumas famílias (SHAPIRO *et al.*, 1988). Em 1991 o gene FMR1 responsável

pela Síndrome do X frágil foi identificado por três grupos independentes de pesquisadores ao clonarem sondas de DNA que detectavam alterações no gene (OBERLE *et al.*, 1991; VERKERK *et al.*, 1991; YU *et al.*, 1991). Pesquisas posteriores determinaram a proteína *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP) codificada por esse gene (PIERETTI *et al.*, 1991; DEVYS *et al.*, 1993), o que tem possibilitado uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da síndrome. Essa proteína é essencial na maturação das sinapses e sua ausência implica no atraso do desenvolvimento dos neurônios (SANTORO *et al.*, 2012).

A Síndrome do X frágil afeta ambos os sexos e incide aparentemente de forma similar em diferentes etnias, sendo responsável por aproximadamente 14% de todos os retardos mentais idiopáticos, no sexo masculino, e por um terço de todos os retardos mentais ligados ao X (TURNER *et al.*, 1996). Estimativas atuais apontam uma prevalência de 1 em cada 3600 homens e 1 em cada 4000 a 6000 mulheres (ACOG, 2010) e o número de portadores do sexo feminino é cerca de 1 em cada 259 e masculino de 1 em 800, em todas as raças e etnias. Mulheres portadoras têm uma chance de 30 a 40% maior de gerarem um filho com retardo e 15 a 20% de uma filha com a mesma condição (WHO, 2010).

### **2.2.2 Bases moleculares da síndrome**

O gene FMR1 apresenta uma repetição do trinucleotídeo CGG na região promotora 5'UT. Essa sequência codifica uma série de resíduos de arginina e é normalmente polimórfica na população (FU *et al.*, 1991; JACKY, 1997). A expressão citogenética do sítio frágil no cromossomo X e a disfunção da atividade gênica de FMR1 são consequência da expansão dessa repetição (FU *et al.*, 1991).

Há quatro classes alélicas para a repetição CGG na região 5'UT de FMR1: alelos normal, intermediário, pré-mutado e mutado (GARBER *et al.*, 2008). Em indivíduos normais os alelos têm de 6 a 50 repetições, sendo 30 o número mais comum (SNOW *et al.*, 1993). Alelos normais não têm instabilidade meiótica ou mitótica (MADDALENA *et al.*, 2001).

Portadores da FXS assintomáticos, mas com um risco substancial de transmitir a desordem têm de 55 a 200 repetições e são considerados como apresentando o alelo em um estado de pré-mutação (MCCONKIE-ROSELL *et al.*, 2005). Esses valores de referência diferem entre autores, sendo que alguns consideram que a variação nessa categoria é de 55-230 repetições (BROWN *et al.*, 1993; NOLIM *et al.*, 1996). Alelos pré-mutados são instáveis e podem sofrer expansão durante a oogênese nas mulheres portadoras (MALTER *et al.*, 1997) e

mitose pós-zigótica em crianças que herdaram a pré-mutação de suas mães (WOHRLE *et al.*, 1993; MCCONKIE-ROSELL *et al.*, 2005). Portadores da pré-mutação também podem apresentar alguns sinais e sintomas característicos. Nas mulheres é comum a ocorrência de menopausa precoce (ALLINGHAM-HAWKINS *et al.*, 1999) e alteração da função ovariana (WITTENBERGER *et al.*, 2007). Em homens idosos podem ser identificados um conjunto de alterações neurológicas específicas conhecido como *Fragile X-associated Tremor/ataxia Syndrome* – FXTAS. (JACQUEMONT *et al.*, 2004).

Há ainda uma categoria de alelos considerada intermediária ou *Gray Zone* que representa a sobreposição da condição normal e pré-mutada. O número de repetições varia de 41 a 54 e usualmente não está associada à instabilidade da repetição (GARBER *et al.*, 2008). Essa variação pode ser considerada normal se as mulheres portadoras do alelo intermediário não têm filhos afetados. Entretanto, em gerações futuras e em parentes distantes esse tamanho de repetição pode se tornar instável e vir a ser associado com a FXS (MADDALENA *et al.*, 2001). Expansão para mutação completa em duas gerações a partir de um alelo de tamanho intermediário com 44 repetições já foi reportada na literatura (TERRACCIANO *et al.*, 2004) e a partir de 59 repetições em uma geração (NOLIN *et al.*, 2003). Assim, a interpretação diagnóstica quando esse tipo de alelo é identificado requer avaliação adicional do risco de expansão (MCCONKIE-ROSELL *et al.*, 2005) uma vez que um alelo intermediário pode mostrar transmissão estável e instável na mesma família (MACPHERSON e SAWYER, 2005). A estabilidade desses alelos tem sido correlacionada à presença de trincas interruptoras AGG entre cada sequência de 9 a 10 repetições de CGG (EICHLER *et al.*, 1994; KUNST e WARREN, 1994)

Nas mutações completas o alelo FMR1 apresenta repetições CGG em número suficiente para reduzir substancialmente ou mesmo inibir a atividade do gene FMR1. O número de repetições está acima de 200, em geral entre 300-600. Em nível molecular, um aumento no número de repetições CGG provoca uma acentuada metilação, tanto dessas repetições como do promotor de FMR1, hipoacetilação das histonas associadas e condensação da cromatina. Essas mudanças epigenéticas culminam no silenciamento transcricional da proteína FMRP (PIERETTI *et al.*, 1991; SUTCLIFFE *et al.*, 1992, JACKY, 1997; COFFEE *et al.*, 2002; MCCONKIE-ROSELL *et al.*, 2005, SANTORO *et al.*, 2012).

A FMRP é uma proteína que se liga seletivamente a mRNAs e regula a síntese de várias proteínas (ASHLEY *et al.*, 1993). Ela é expressa em uma variedade de tecidos, com concentração maior nos neurônios e testículos (HINDS *et al.*, 1993; DEVYS *et al.*, 1993), consistente com as características fenotípicas mais marcantes da FXS: retardo mental e

macroorquidismo. FMRP tem papel chave no desenvolvimento cerebral pré e pós-natal (DEVYS *et al.*, 1993). Essa proteína está localizada nos espaços pós-sinápticos dos processos espinhosos encontrados nos dendritos, onde se liga e reprime a tradução de um subconjunto de mRNAs alvos (ASHLEY *et al.*, 1993). Estudos utilizando camundongos *knockout* para *Fmr1* propuseram que a FMRP está envolvida no processo de maturação e desenvolvimento dos dendritos no cérebro e plasticidade sináptica (HUBER *et al.*, 2002). Ela parece desempenhar um papel importante no balanço de quais conexões entre os neurônios o cérebro mantém ou elimina. A ausência de FMRP implica na desregulação das vias responsáveis por esse controle, o que culmina na incapacidade de estabelecer e manter sinapses fortes que são requeridas para aprendizagem e memória (MIYASHIRO *et al.*, 2003; BEAR *et al.*, 2004).

### 2.2.3 Padrão de herança

A FXS mostra um padrão único de herança ligada ao X: mulheres afetadas podem ou não apresentar inabilidade intelectual, assim como podem revelar ou não o sítio frágil após cultura de linfócitos e análise citogenética. Sherman *et al.* (1985) classificaram como um padrão de herança dominante incomum ligada ao X, uma vez que 30% das mulheres portadoras apresentam algum grau de comprometimento intelectual e 20% dos homens com o cromossomo X frágil são fenotipicamente normais.

Diferente de outras características ligadas ao X, a FXS tem um padrão complexo de segregação. Em geral as desordens ligadas ao X expressam-se em estado de hemizigose e nesses casos, homens normais não transmitem a doença para sua prole. Na FXS, homens portadores do cromossomo X frágil, mas que são fenotipicamente normais (*normal transmitting male* – NTM) transmitem o alelo para suas filhas, que também serão intelectualmente normais mas apresentarão uma proporção de filhos com retardo. As filhas de um NTM terão maior probabilidade de apresentar prole afetada do que as mães desses homens, o que ocasiona um aparente aumento de penetrância nas gerações seguintes (SHERMAN *et al.*, 1985). Esse fenômeno foi denominado Paradoxo de Sherman e é explicado pela expansão da repetição CGG que ocorre quando alelos pré-mutados são transmitidos pela mãe, mas não pelo pai (SUTHERLAND, 1991; FU *et al.*, 1991, ROUSSEAU *et al.*, 2011).

A mutação do gene FMR1 é um processo de várias etapas que progride de alelos normais para os relativamente estáveis de tamanho intermediário, seguida para alelos pré-mutados instáveis e, finalmente, para mutação completa (SUTHERLAND, 1991; MORTON e MACPHERSON, 1992). A pré-mutação, quando transmitida por uma mulher, pode sofrer

modificação, ficando ainda como pré-mutação ou transformar-se em uma mutação completa. O número de repetições CGG tende a aumentar de uma geração a outra, durante a meiose feminina (MALTER *et al.*, 1997) ou nas mitoses pós-zigóticas na criança que herdou o alelo da mãe (WOHRLE *et al.*, 1993; MCCONKIE-ROSELL *et al.*, 2005). Portanto, a probabilidade de um indivíduo gerar descendentes afetados está relacionada ao número de repetições CGG que apresenta. Fu *et al.* (1991) mostraram que o risco é proporcional ao tamanho da repetição e que se aproxima de 100% quando a expansão apresenta mais de 100 repetições.

Os homens com alelos pré-mutados, por sua vez, os transmitem para suas filhas com o número de repetições praticamente sem alteração. Essa característica intrigou os pesquisadores e estudos recentes têm sugerido um papel importante do gene FMR1 durante a espermatogênese. Grandes expansões da repetição CGG seriam altamente instáveis no desenvolvimento dos espermatozoides. Assim apenas os alelos pré-mutados estariam presentes na linhagem germinativa de homens portadores tanto do alelo pré-mutado, como mutado (WITTENBERGER *et al.*, 2007). Estudos envolvendo a análise da mutação de FMR1 em várias genealogias concluíram que os descendentes portadores da mutação completa herdaram de suas mães o alelo pelo menos em um estado de pré-mutação (ROUSSEAU *et al.*, 1991; HEITZ *et al.*, 1992; MACPHERSON *et al.*, 1992). Desse modo, nas famílias, as primeiras mutações completas ocorrem na prole de mulheres portadoras da pré-mutação (YU *et al.*, 1992; SNOW *et al.*, 1993).

Quanto à expressão, a Síndrome do X-frágil apresenta-se como uma desordem de penetrância incompleta e expressividade variável (MULLEY e SUTHERLAND, 1987), em que o gene é penetrante em aproximadamente 53% das mulheres e 100% dos homens (ROUSSEAU *et al.*, 1991, SANTORO *et al.*, 2012). Nas mulheres o quadro clínico é, em geral, menos grave provavelmente pela compensação do segundo cromossomo X. A porcentagem de cromossomos X ativos que carregam o alelo normal em relação aos que carregam o alelo mutado pode modificar a severidade dos sintomas, como esperado para qualquer condição ligada ao X (ROSENBERG *et al.*, 1991; SHERMAN *et al.*, 2005).

#### **2.2.4 Características clínicas**

A FXS apresenta grande variabilidade fenotípica cuja principal característica clínica é o retardo mental com diversos graus de severidade. Pode estar associado à macroorquidia nos homens e a uma variedade de dismorfismos faciais, como orelhas grandes, fronte proeminente, face alongada, má oclusão dentária e mandíbula proeminente. Também são frequentes hiperatividade e alterações comportamentais (NUSSBAUM e LEDBETTER, 1986). Embora

não haja um elemento único específico da síndrome, a identificação de um conjunto de características combinadas possibilita o rastreamento de possíveis portadores (BUTLER *et al.*, 1991)

Indivíduos afetados podem apresentar desordens psiquiátricas como hiperatividade e *déficit* de atenção, além de características autísticas tais como contato visual pobre, aversão ao contato físico, estereotípias de mãos, mordedura das mãos e defensividade tátil (THAPAR *et al.*, 1994; HAGERMAN e SILVERMAN, 1996).

Distúrbios de linguagem também têm sido reportados, como linguagem perseverativa, atraso na aquisição da fala, associado à fala geralmente acelerada e repetitiva (NIELSEN *et al.*, 1983) com alteração de ritmo e fluência (HAGERMAN e SILVERMAN, 1996).

Outros achados clínicos incluem pele macia, hiperextensibilidade articular dos dedos, hipotonia, palato em forma de arco, pés planos e peito escavado (HAGERMAN *et al.*, 1984).

Por ser uma desordem ligada ao X, nas mulheres as características da síndrome manifestam-se menos severamente que nos homens, principalmente em termos de comprometimento cognitivo (FREUND *et al.*, 1993). As funções cognitivas podem variar de inteligência normal a dificuldades de aprendizado e retardo mental. As mulheres afetadas têm um risco aumentado de desenvolverem problemas emocionais e de comportamento como ansiedade, depressão, personalidade esquizóide, hiperatividade, timidez, deficiência de atenção, estereotípias e agressividade (CRONISTER *et al.*, 1991; de VRIES *et al.*, 1996; KEYSOR e MAZZOCCO, 2002).

### **2.2.5 Diagnóstico**

Procedimentos diagnósticos são recomendados nos casos em que os indivíduos apresentam atraso de desenvolvimento de causa não estabelecida (GARBER *et al.*, 2008). A etapa inicial de rastreamento consiste em identificar as principais características fenotípicas e também avaliar o histórico de família. A presença na família do probando de retardo mental, insuficiência ovariana primária ou dificuldades de aprendizagem, devem aumentar a suspeita de mutações em FMR1 (MCCONKIE-ROSELL *et al.*, 2007).

Uma vez que os indivíduos são corretamente diagnosticados, mesmo na ausência de um tratamento específico, o diagnóstico precoce da FXS possibilita intervenção educativa e terapêutica (VIANNA-MORGANTE, 1999). De acordo com a WHO (2010), intervenções terapêuticas, como terapia da fala, terapia ocupacional, psicoterapia e educação especial, podem melhorar consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, a identificação de



portadores de alelos pré-mutados é importante para o aconselhamento genético reduzindo assim o risco de recorrência nas famílias (PANDEY *et al.*, 2004)

Os principais procedimentos diagnósticos são: análise citogenética para identificação do sítio fra(X) e análises moleculares por reação em cadeia da polimerase (PCR), a fim de determinar o número de repetições CGG e por *Southern blot*, que estabelece o tamanho e o *status* de metilação da repetição (IQBAL *et al.*, 2000).

Para a análise citogenética, induz-se a expressão do sítio frágil sensível ao folato (FRAXA) cuja frequência pode variar em função das condições de cultura (SUTHERLAND e LEDBETTER, 1988). Em média, são contadas 100 metáfases para homens e 150 para mulheres e FRAXA deve ser evidenciado em pelo menos 4% delas para que o diagnóstico da síndrome seja positivo (JACKY *et al.*, 1991). FRAXA é expresso em 10-40% das metáfases de homens com retardo mental, menos frequentemente em mulheres com retardo e mais raramente naquelas portadoras, mas com funções cognitivas normais e quase nunca é expresso em homens transmissores normais (RICHARDS e SUTHERLAND, 1992). Logo, a citogenética apresenta restrições para a detecção de portadores de alelos pré-mutados o que limita seu valor no aconselhamento genético (MADDALENA *et al.*, 2001; AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS, 2006).

A técnica de PCR utiliza *primers* flanqueadores para amplificar o fragmento de DNA que abrange a região da repetição. Desse modo, o tamanho dos produtos da reação possibilita estimar o número aproximado de repetições presente em cada alelo do indivíduo testado. Entretanto, a eficiência da reação é inversamente proporcional ao número de repetições CGG (SHERMAN *et al.*, 2005). Assim essa ferramenta é aplicável para identificação de alelos pré-mutados (60-100 repetições CGG) e apresenta limitações para a detecção de mutações completas, uma vez que com o aumento do número de repetições CGG torna-se mais difícil amplificar regiões com alto conteúdo de citosinas e guaninas além da formação de uma forte estrutura secundária que desfavorece a amplificação (KANG *et al.*, 1995).

O diagnóstico por *Southern blot* requer a utilização de um sistema de digestão com duas enzimas: *EcoRI* e outra enzima sensível à metilação *EagI* ou *BssHII* e hibridização com uma sonda gene-específica. Como FMR1 está quase sempre metilado quando o número de repetições CGG é superior a 230, não ocorre clivagem dos sítios apropriados pelas enzimas sensíveis à metilação. Alelos metilados (inativos) são clivados apenas por um enzima resultando em um fragmento de 5,1 kb, enquanto os não-metilados (ativos) são clivados por ambas as enzimas gerando fragmentos de 2,8 kb (WARREN e NELSON, 1994). Esse procedimento mostra-se adequado para detectar expansões maiores que 60-200 repetições, e é menos eficiente quando as

expansões são menores que 60 ou correspondem à faixa de alelos intermediários (HUSSEIN, 1998).

### 2.3 Citogenética do X frágil

A Síndrome do X frágil é caracterizada pela presença de um sítio que é visualizado como uma região descontínua ou constrição na extremidade do braço longo do cromossomo X. A detecção citogenética desse sítio requer que as células sejam cultivadas sob condições que restrinjam a disponibilidade de ácido fólico a ser processado pela via do folato (SUTHERLAND, 1977) ou por meio da adição de inibidores do metabolismo de timidilato (GLOVER, 1981; TOMMERUP *et al.*, 1981).

Além disso, outros parâmetros tais como pH elevado (7.5 – 7.6), níveis mais baixos de suplementação com soro bovino fetal (FBS) e um período maior de cultura (96 h) podem aumentar a eficiência de expressão (SUTHERLAND, 1979). Branda e Nelson (1982) mostraram que a captação celular de folato é inversamente proporcional ao pH e que quanto menor o pH, maiores são os níveis de folato intracelular. Quanto à adição de FBS, Jacky (1997) salientou que maiores concentrações do soro disponibilizam mais ácido fólico no meio, entretanto, a suplementação é importante, pois resulta em melhor índice mitótico. Diferentes estudos apontaram que estender o período de cultura para 96 h pode aumentar a frequência de expressão dos sítios frágeis (JACOBS *et al.*, 1980; JENNINGS *et al.*, 1980; MATTEI *et al.*, 1981). De acordo com Jacky (1997), esse aumento pode favorecer a depleção de ácido fólico e timidina no meio, contribuindo assim para maior expressão de fra(X).

Níveis exógenos de ácido fólico presentes na dieta do paciente bem como do efluxo de folato a partir dos eritrócitos, também podem interferir no resultado final da cultura (JACKY *et al.*, 1991). Tem sido reportada uma redução na frequência de fra(X) quando os pacientes estão sob terapia à base de folato. Nesses casos, o uso de inibidores de ácido fólico resulta em maior frequência de expressão comparado aos meios com restrição de folato (BROWN *et al.*, 1984; NIELSEN e TOMMERUP, 1984). Desse modo, o *Ad Hoc Committee* (JACKY, 1991) tem recomendado que pelo menos dois sistemas de indução (Tabela 2) sejam empregados nas análises citogenéticas de indivíduos com suspeita de X frágil, e que pelo menos um deles utilize um antagonista de folato ou timidilato.

Tabela 2 – Sistemas de cultura para identificação do sítio frágil Xq27.3

- 
- 1 – meios com depleção de folato/timidina como TC 199 ou MEM-FA, com 5% ou menos de FBS, pH 7.6 e duração da cultura 72-96 h.
  - 2 – adição de inibidores da dihidrofolato redutase, como metotrexato (Mtx) ( $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M) ou trimetropina (13–26 mg/mL).
  - 3 – adição de inibidores da timidilato sintase, como fluorodeoxiuridina (FUdR) ( $10^{-9}$ – $10^{-7}$  M) ou fluorodeoxicidina (FCdR).
  - 4 – adição de inibidores da ribonucleotídeo redutase, como excesso de timidina (300–1200 mg/mL)
- 

Adaptado de Jacky *et al.* (1991); Jacky (1997).

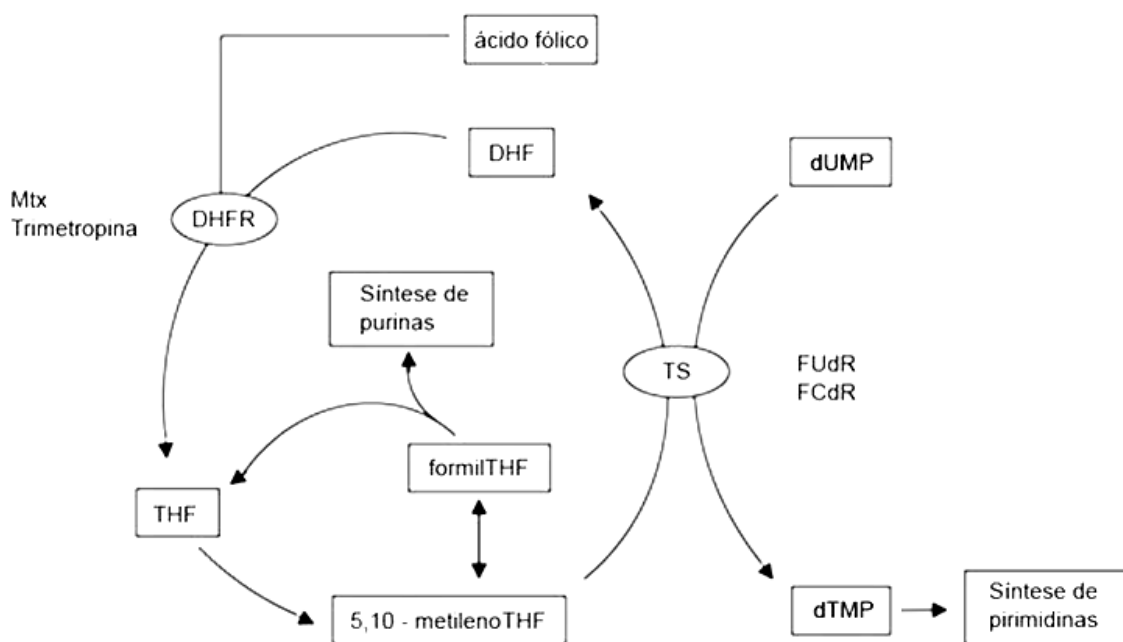
Quando se utiliza o sistema de indução por antagonistas, esses devem ser acrescentados ao meio de cultura 24 h antes da colheita. Tem sido demonstrado que o período que os linfócitos passam sob condições de depleção ou expostos a ação dos inibidores é um fator importante para a expressão dos sítios frágeis (SUTHERLAND, 1979). Após o término desse período, as etapas subsequentes de hipotonização e fixação dos tratamentos seguem os procedimentos de rotina do laboratório. Para a identificação do sítio FRAXA é necessário analisar 100 metáfases para homens e 150 para mulheres (JACKY *et al.*, 1991; JACKY, 1997). Recomenda-se que o rastreamento inicial seja efetuado em lâminas com coloração sólida, pois possibilita a detecção do sítio frágil com mais clareza, uma vez que essa região aparece como uma constrição ou descontinuidade pouco corada ao microscópio (SUTHERLAND, 1991; JACKY, 1997). Entretanto o bandeamento G deve ser realizado para confirmar a presença de FRAXA e também para distingui-lo de outros sítios frágeis constitutivos autossomais em 6q26 e 7q36 e no cromossomo X (Xq27.2; Xq28) (JACKY, 1997). O bandeamento também é uma ferramenta importante para análise cromossômica padrão, que deve ser incluída no diagnóstico dos pacientes que apresentam retardo mental (JACKY *et al.*, 1991).

### **2.3.1 Expressão citogenética dos sítios frágeis com o uso de antagonistas**

Em 1977, Sutherland observou que poderia se induzir a expressão do sítio frágil se as células fossem cultivadas no meio TC 199 que é deficiente em ácido fólico e timidina. A adição de inibidores como Mtx (SUTHERLAND, 1979), trimetropina (CALVA-MERCADO *et al.*, 1983), FUdR (GLOVER, 1981; TOMMERUP *et al.*, (1981) e FCdR (JACKY e SUTHERLAND, 1983) em meios de cultura convencionais também aumentava a expressão do

sítio frágil. Esses antagonistas atuam na via de biosíntese das bases nitrogenadas (SUTHERLAND, 1979).

Metotrexato e trimetropina inibem competitivamente a enzima dihidrofolato redutase (DHFR) que catalisa a conversão de dihidrofolato (DHF) e do ácido fólico absorvido pelo intestino a tetrahydrofolato (THF). Essa conversão está integrada à produção de 5,10-metilenoTHF, que é substrato para a enzima timidilato sintetase (TS) na metilação de desoxiuridina monofosfato (dUMP) para desoxitimidina monofosfato (dTMP), única fonte *de novo* de timidina em mamíferos (CHOI e MASON, 2002). Compostos como FUdR e FCdR atuam em um ponto mais específico na biosíntese de timidilato inibindo a enzima TS. (ERBE, 1979). Uma representação esquemática do metabolismo do folato é mostrada na figura 1, em que é possível observar os locais de atuação dos antagonistas citados.



Adaptado de Jacky (1997); Hubner e Houlston (2009).

Figura 1 – Via simplificada do metabolismo do folato evidenciando os pontos de atuação dos principais antagonistas utilizados para elucidar FRAXA. Mtx, metotrexato; FUdR, fluorodeoxiuridina; FCdR, fluorodeoxicidina; DHFR, dihidrofolato redutase; THF, tetrahydrofolato; DHF, dihidrofolato; TS, timidilato sintetase; dUMP, desoxiuridina monofosfato; dTMP desoxitimidina monofosfato.

Dois mecanismos têm sido sugeridos para explicar a atuação dos antagonistas na expressão do sítio frágil (KUNZ, 1996). Um deles propõe que ocorre uma falha na condensação durante a mitose como consequência da inibição na síntese de DNA por uma via de *feedback*

negativo (LAIRD *et al.*, 1987; SUTHERLAND, 1988). A inibição da biosíntese de dTMP resulta em baixos níveis de dGTP e de dTTP e aumento de dCTP, dATP e dUTP. Um *pool* reduzido de dGTP associado ao alto conteúdo G.C da repetição CGG pode restringir a síntese de DNA e ocasionar lesões nos cromossomos. O outro mecanismo propõe que a expressão citogenética do sítio frágil deve-se à incorporação errônea de bases que causa perturbações na conformação da cromatina (KRUMDIECK, 1983; JACKY, 1997). A inibição da biosíntese de dTMP resulta em um aumento das razões dNTP:dTTP ou dNTP:dGTP, provocando a incorporação errônea de bases na sequência CGG expandida. O mecanismo de reparo não consegue corrigir esses erros antes da condensação cromossômica (REIDY, 1987, 1988; JACKY, 1997).

Tendo em vista a ação desses antagonistas na expressão dos sítios frágeis, entre eles fra(X), esse trabalho utilizou dois diferentes inibidores que atuam em pontos distintos da via de biosíntese de dTMP. Metotrexato ou fluorodeoxiuridina foram adicionados a três diferentes meios de cultura disponíveis comercialmente e as frequências de expressão de fra(X) foram determinadas em cada uma dessas situações na análise de dois indivíduos com indicativo clínico da Síndrome do X frágil.

### 3 OBJETIVOS

Considerando o avanço dos equipamentos digitais para análises de imagem e microscopia, que facilitaram e aumentaram a acurácia das análises citogenéticas, o presente trabalho teve como objetivo geral identificar a expressão de fra(X) em dois casos com suspeita de X frágil por meio do uso dessas ferramentas. Para tal dois sistemas de indução de sítios frágeis em combinação com três diferentes meios de cultura foram empregados.

Os objetivos específicos foram:

- i. verificar se diferentes meios de cultura em combinação ou não com antagonistas evidenciam o sítio fra(X);
- ii. identificar a presença do sítio fra(X) em preparações com coloração sólida com Giemsa;
- iii. realizar bandeamento G a fim de confirmar a presença do sítio frágil no cromossomo X e distingui-lo de outros sítios constitutivos;
- iv. calcular a frequência de expressão de fra(X) nos indivíduos analisados.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento experimental**

As análises citogenéticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa/MG.

A coleta de sangue, bem como os demais procedimentos a seguir, foram executados de acordo com as normas de segurança e Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Os responsáveis pelos participantes foram informados sobre o objetivo dessa pesquisa e assinaram um termo de consentimento para participação (anexo B).

### **4.2 Estudo citogenético**

O estudo citogenético foi realizado a partir de sangue periférico, por conferir menor desconforto e risco à saúde dos voluntários. Além disso, a cultura de linfócitos tem sido considerada a principal metodologia para detecção citogenética de sítios frágeis (SUTHERLAND, 1991).

#### **4.2.1 Grupo amostral**

Essa pesquisa contou com a participação de dois irmãos, um com 35 e outro com 25 anos, com indicativo clínico de Síndrome do X frágil. Os responsáveis legais consentiram na participação voluntária desses indivíduos.

#### **4.2.2 Coleta de sangue**

A coleta de sangue foi realizada por punção venosa de forma asséptica com seringas estéreis, heparinizadas e descartáveis. Foram coletadas cerca de 5 mL de sangue de cada indivíduo. Para o lançamento da cultura gotejaram-se cerca de 12 gotas de sangue para cada frasco contendo 5 mL de meio de cultura.

### 4.2.3 Cultura do material citogenético

Utilizaram-se três tipos de meio de cultura disponíveis comercialmente: LymphoGrow (Cytogen<sup>®</sup>), PB-MAX (GIBCO<sup>®</sup>) e RPMI 1640 (Sigma<sup>®</sup>). Os dois primeiros são meios completos, já possuindo em sua formulação fitohemaglutinina, o mitógeno responsável pela proliferação dos linfócitos, antibióticos estreptomicina e penicilina e pH tamponado. O meio RPMI 1640 foi suplementado com soro bovino fetal a 5% (Sigma<sup>®</sup>), fitohemaglutinina forma M a 1% (GIBCO<sup>®</sup>), tampão HEPES 20 mM (Sigma<sup>®</sup>) e L-glutamina 2mM (Sigma<sup>®</sup>) (BARCH *et al.*, 1997).

Em câmara de fluxo laminar, gotejou-se 0,5 mL de sangue total homogeneizado em 5 mL de cada um dos meios de cultura acima descritos (VERMA e BABU, 1995; BARCH *et al.*, 1997). Para cada indivíduo foram preparados três tubos para cada meio disponível os quais foram incubados com a tampa frouxamente rosqueada em estufa de CO<sub>2</sub> (Sanyo<sup>®</sup> modelo MCO-18AC) a 37°C por 72 horas.

Para a identificação de eventuais sítios frágeis foram utilizadas as seguintes concentrações de antagonistas: 8 µg/mL de Metotrexato (Sigma<sup>®</sup>) e 0,25 µg/mL de Fluorodeoxiuridina (Sigma<sup>®</sup>) (JACKY *et al.*, 1991). O esquema da distribuição dos tratamentos está representado na tabela 3. Essas substâncias foram adicionadas 72 horas após o início da cultura sendo os linfócitos incubados por mais 24 horas a 37°C. Os procedimentos de colheita, hipotonização e fixação foram os mesmos para as culturas com e sem antagonistas, com diferença entre elas apenas no tempo total de duração das culturas.

Tabela 3 – Distribuição dos tratamentos com antagonistas por meio de cultura utilizado.

Meio de cultura	Inibidor	Tempo de cultura
RPMI 1640 S*	FUdR 0,25 µg/mL	96 h
	Mtx 8 µg/mL	96 h
	—	72 h
LymphoGrow	FUdR 0,25 µg/mL	96 h
	Mtx 8 µg/mL	96 h
	—	72 h
PB-MAX	FUdR 0,25 µg/mL	96 h
	Mtx 8 µg/mL	96 h
	—	72 h

\*RPMI 1640 S: meio RPMI suplementado com FBS, HEPES, fitohemaglutinina e L-glutamina



#### **4.2.4 Coleta dos linfócitos, bloqueio e hipotonização**

As etapas de bloqueio e hipotonização foram realizadas segundo procedimentos previamente descritos por Barch *et al.* (1997); Saunders e Czepulkowski (2001) e Maluf *et al.* (2011), com modificações. Colcemide (Sigma<sup>®</sup>) foi adicionada em uma concentração final de 0,1 µg/mL há 71 horas e 45 min após o início, nas culturas sem antagonista e há 95 horas e 45 minutos naquelas com antagonista. Os tubos foram então incubados a 37°C por mais 15 min. Em seguida o material foi centrifugado a 174 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e efetuou-se homogeneização do material restante. Foram adicionadas 10 mL de solução hipotônica (0.075 M KCl) a 37°C e o material foi incubado a 37°C por 30 min. Os tubos foram novamente centrifugados a 174 g por 15 min e então fixados em metanol-ácido acético 3:1. Foram realizadas mais três trocas de fixador até se obter uma coloração límpida e quase transparente. Por último, desprezou-se o sobrenadante deixando cerca de 0,5 a 1 mL de sedimento concentrado e fixado.

#### **4.2.5 Preparo das lâminas**

As lâminas foram criteriosamente limpas e mantidas em água destilada gelada até o momento do uso. Utilizou-se a técnica de gotejamento e secagem ao ar. Basicamente, gotejou-se de 2 a 3 gotas da suspensão celular, em lâminas de vidro com uma inclinação de cerca de 45° para melhor espalhamento dos cromossomos. (BARCH *et al.*, 1997; SAUNDERS e CZEPULKOWSKI, 2001).

#### **4.2.6 Coloração sólida e bandeamento G**

Para coloração sólida, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa 5% em tampão Sørensen pH 6.8, por 3 a 4 minutos. Em seguida lavadas duas vezes em água destilada e então secas em chapa aquecedora a 50°C.

Para o bandeamento GTG (*G-bands by trypsin using Giemsa*) as lâminas foram envelhecidas em estufa por um período de 12 a 24 horas, a 60°C. Então foram lavadas em solução salina isotônica, imersas em solução de tripsina (GIBCO<sup>®</sup>) 0,25% por 4 a 11 segundos e novamente lavadas duas vezes em salina isotônica. Em seguida foram coradas em solução de Giemsa 5% em tampão Sørensen pH 6.8, por 3 a 4 minutos, lavadas em água destilada para remoção do excesso de corante e então secas em chapa aquecedora a 50°C (BARCH *et al.*,

1997). Uma lâmina teste foi preparada para cada caso analisado, a fim de se determinar os tempos de coloração e digestão em tripsina mais adequados para produzir melhor padrão de bandas.

#### **4.2.7 Análise dos dados**

As lâminas foram visualizadas em objetiva de imersão de 100X acoplada a um fotomicroscópio Olympus<sup>TM</sup>, modelo BX60, equipado com acessórios de análise de imagem, iluminação de campo claro e de fluorescência. As imagens foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera acoplada ao microscópio e a um computador equipado com placa digitalizadora.

Planejou-se a análise de pelo menos 100 metáfases para cada indivíduo, conforme recomendações do *Ad Hoc Committee of the Fourth International Workshop on the Fragile X and X-linked Mental Retardation* (JACK *et al.*, 1991).

Para comparação dos valores médios de metáfases por lâmina obtidos dos tratamentos com FUDR ou Mtx nos três diferentes meios de cultura utilizou-se o teste F a 5% de significância.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Média de metáfases por lâmina

No presente estudo, três meios de cultura foram utilizados em combinação com os antagonistas FUdR e Mtx. As culturas com RPMI 1640, LymphoGrow e PB-MAX nas quais foi adicionado FUdR apresentaram número médio de metáfases de 19, 27 e 24 metáfases por lâmina, respectivamente, para o irmão 1; 20, 22 e 26 metáfases para o irmão 2. As culturas tratadas com Mtx apresentaram número reduzido tanto de linfócitos como de metáfases, com média inferior a 10 metáfases por lâmina em todos os meios utilizados. As médias obtidas nos ensaios de cada antagonista para os dois irmãos foram submetidas à análise de variância e o teste F não foi significativo a 5% de probabilidade (tabelas 4 e 5) O número médio de metáfases obtidas por tratamento está representado na figura 2. As barras verticais em azul escuro correspondem ao número de metáfases por lâmina do grupo controle (culturas sem antagonistas). A adição de FUdR provocou em média uma redução de 45,38% no número de metáfases por lâmina. Nas culturas com Mtx essa redução foi de 80,5%.

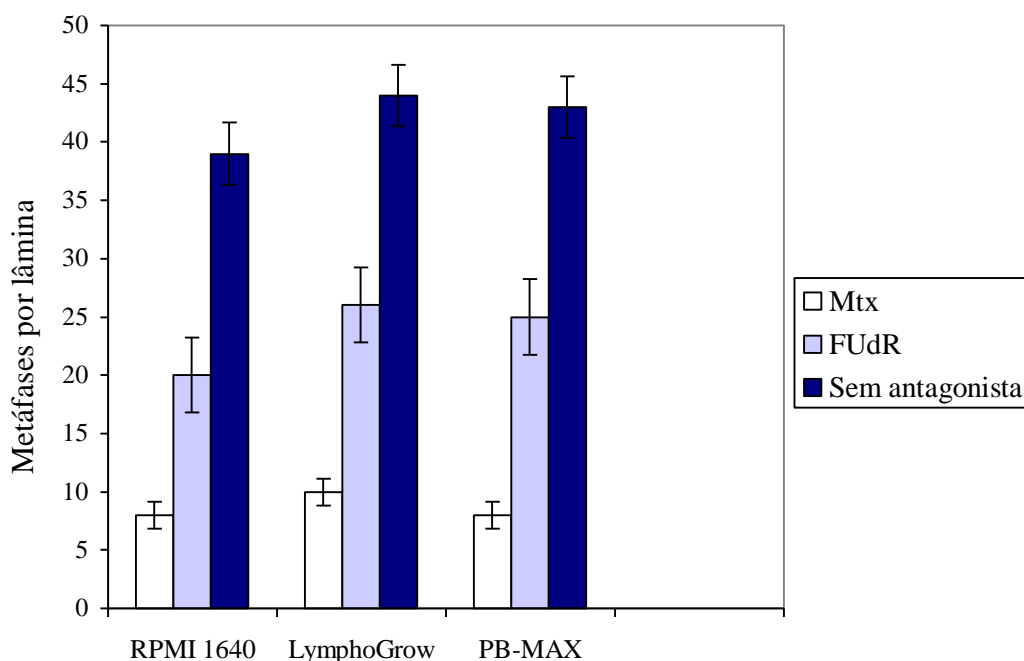


Figura 2 – Histograma mostrando o número médio de metáfases por lâmina para os dois irmãos observado nas culturas com metotrexato (Mtx),  $\bar{x} = 8,7 \pm 1,15$ , fluorodeoxiuridina (FUdR),  $\bar{x} = 23,7 \pm 3,21$ , e sem antagonista  $\bar{x} = 42 \pm 2,64$ . Notar que nas culturas com antagonista há uma redução em média de 45,38% no percentual de metáfases quando se utiliza FUdR e 80,5% quando o antagonista é Mtx.

Tabela 4 – Análise de variância das médias de metáfases obtidas nos ensaios com os meios de cultura RPMI 1640, LymphoGrow e PB-MAX em combinação com o antagonista FUDR.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Meios de cultura	2	88,67	44,335	
Resíduo	11	196,75	17,886	2,479 <sup>NS</sup>
Total	13	285,42		

<sup>NS</sup> não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 5 – Análise de variância das médias de metáfases obtidas nos ensaios com os meios de cultura RPMI 1640, LymphoGrow e PB-MAX em combinação com o antagonista Mtx.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Meios de cultura	2	4,667	2,334	
Resíduo	9	6,25	0,694	3,36 <sup>NS</sup>
Total	11	10,917		

<sup>NS</sup> não significativo a 5% de probabilidade

## 5.2 Montagem do cariótipo

Foram analisadas um total de 208 metáfases do irmão 1 e 205 do irmão 2, dentre lâminas com coloração sólida e bandeadas (Banda GTG). Essas lâminas foram preparadas a partir das culturas tratadas com Mtx e FUDR. Para as culturas sem antagonistas foram analisadas pelo menos uma lâmina por frasco, a fim de se estimar o número de metáfases nas condições padrão de cultivo. Cariótipos dos irmãos 1 e 2 estão representados, respectivamente, nas figuras 3 e 4 em que o cromossomo fra(X) está evidente em preparação com coloração sólida com Giemsa e por bandeamento G. Essas metáfases são oriundas de frascos em que se adicionou FUDR. Uma amostra de cromossomos fra(X) ampliados, também obtidos sob as mesmas condições de restrição, está representada nas figuras 5 e 6, nas quais é possível observar com maior detalhamento a constrição característica que se forma na região do sítio frágil.

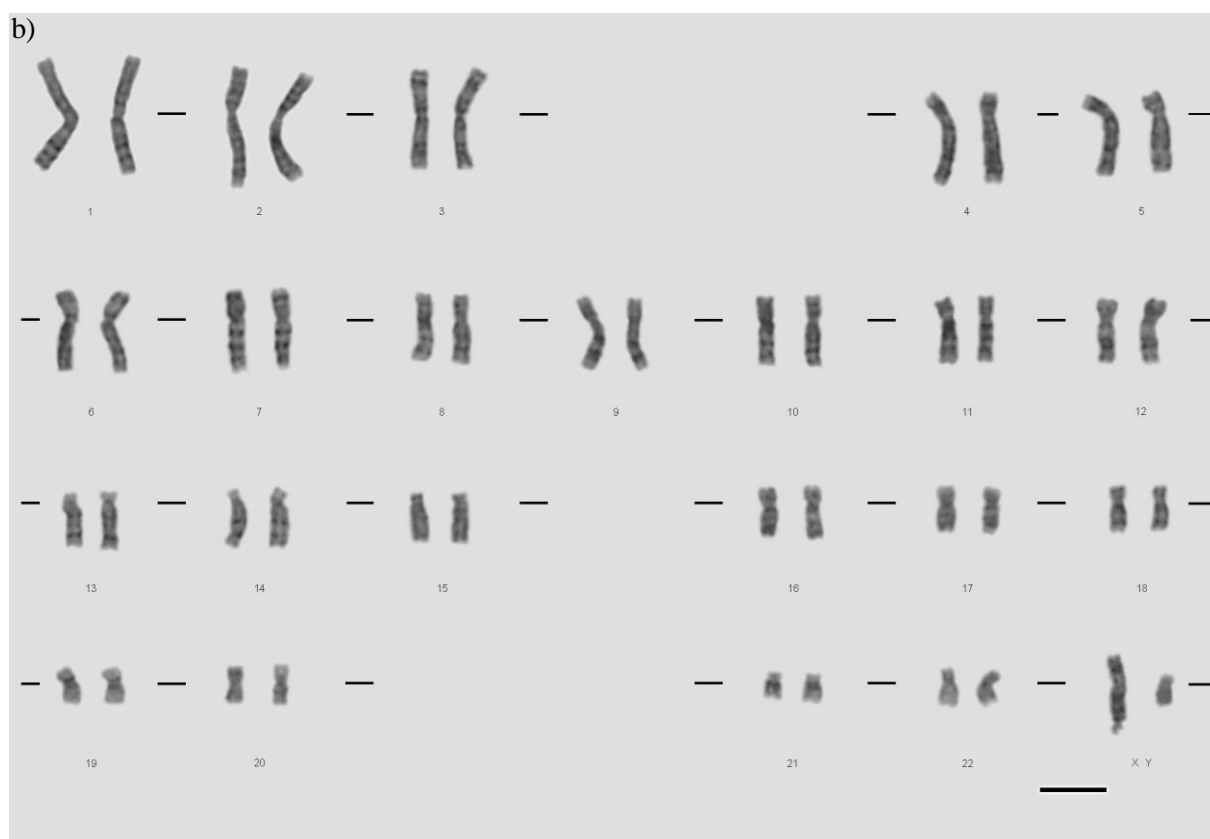
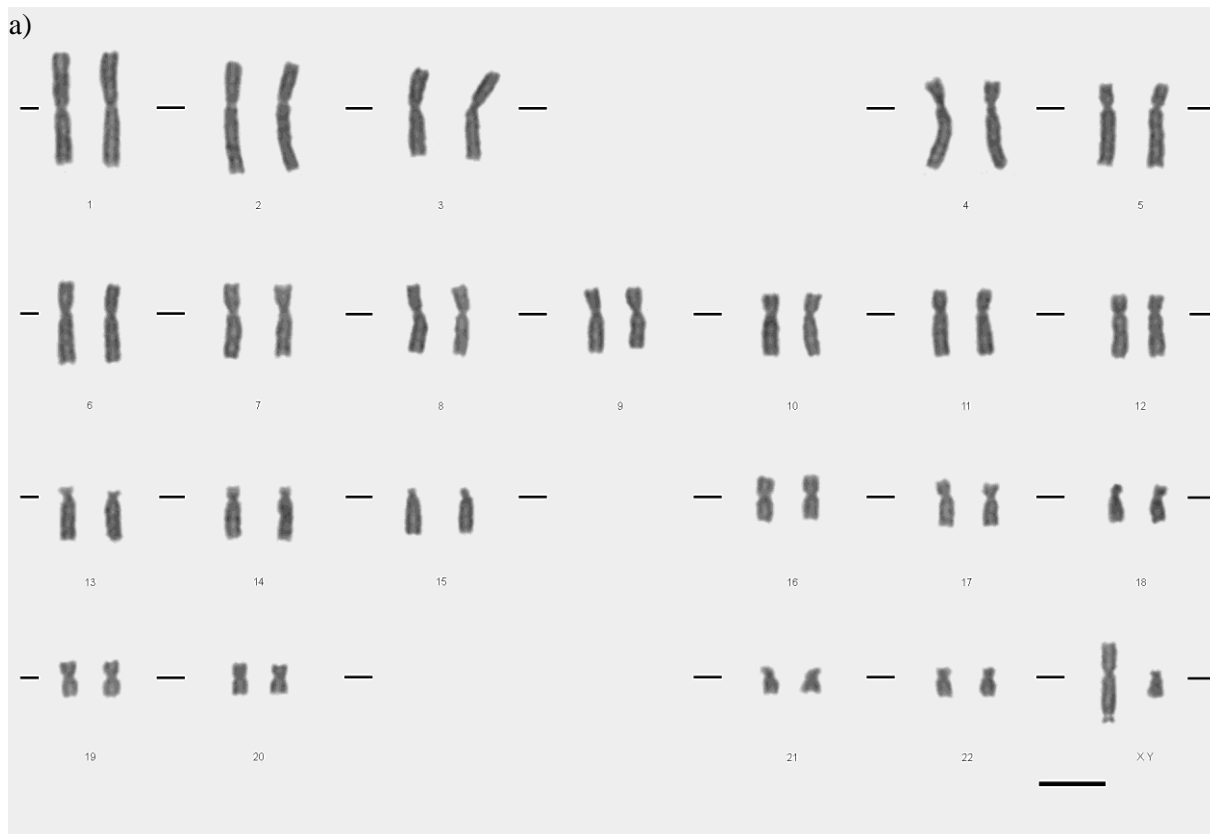


Figura 3 – Cariogramas do irmão 1 com  $2n = 46, Y, fra(X)(q27.3)$  obtidos a partir de culturas tratadas com  $0,25 \mu\text{g/mL}$  de FUDR. O sítio  $fra(X)$  é visualizado como uma região descontínua na porção terminal do braço longo do cromossomo X. a) coloração sólida com Giemsa 5%. b) Bandeamento GTG. Barra =  $10\mu\text{m}$ .

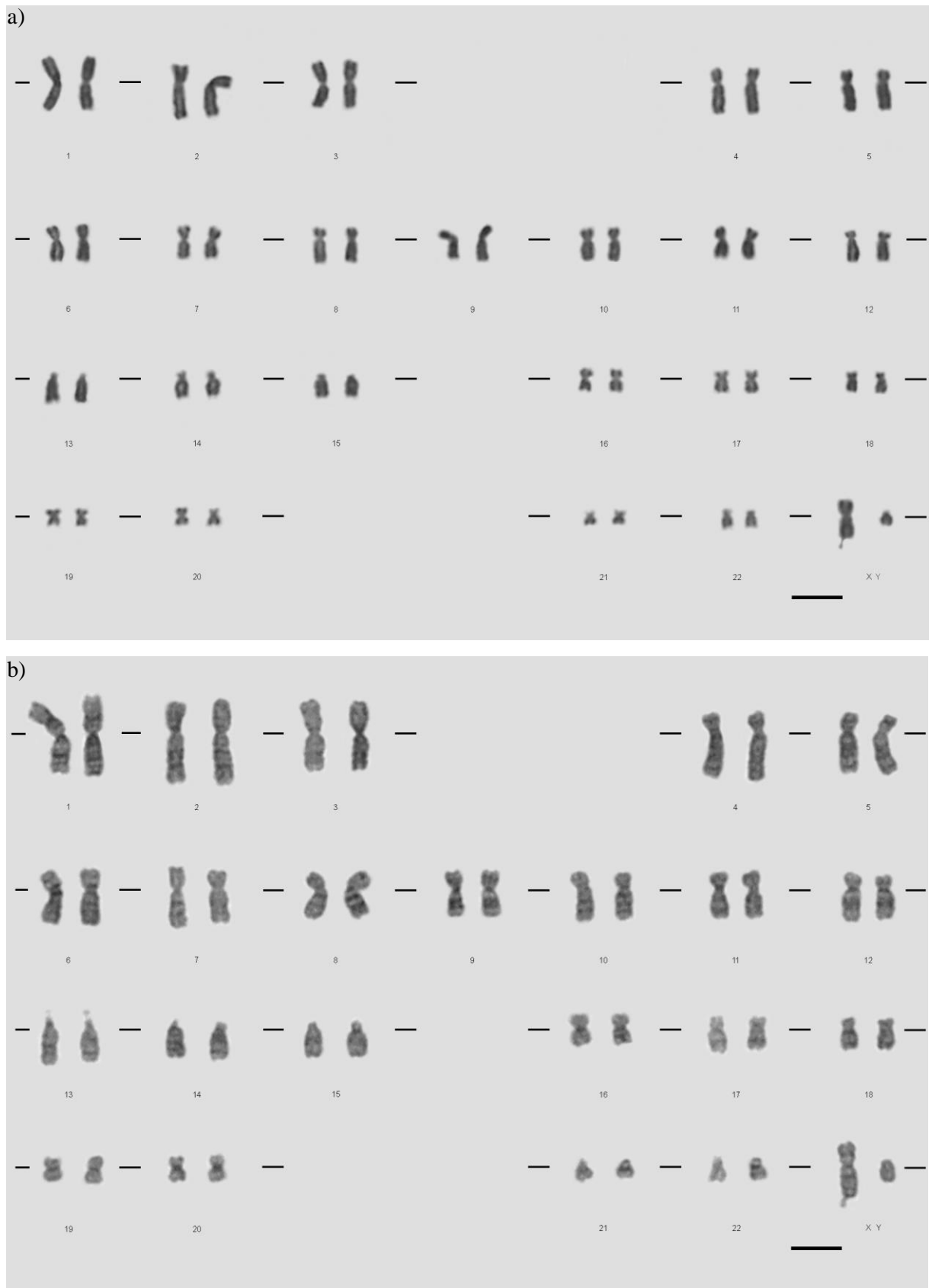


Figura 4 – Cariogramas do irmão 2 com  $2n = 46, Y, fra(X)(q27.3)$  obtidos a partir de culturas tratadas com  $0,25 \mu\text{g/mL}$  de FUdR. O sítio  $fra(X)$  é visualizado como uma região descontínua na porção terminal do braço longo do cromossomo X. a) coloração sólida com Giemsa 5%. b) Bandeamento GTG. Barra =  $10\mu\text{m}$ .

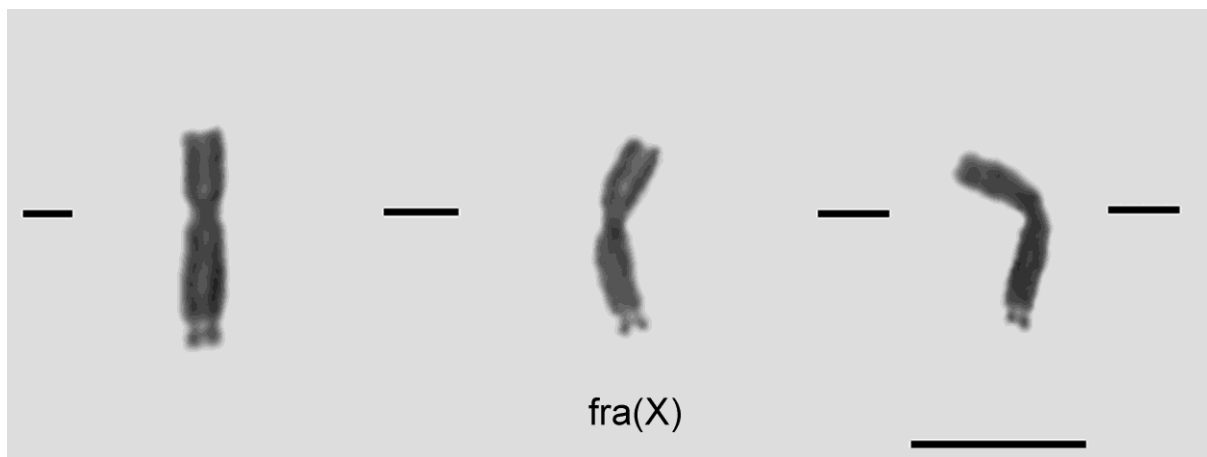


Figura 5 – Amostra de cromossomos fra(X) ampliados do irmão 1 obtidos a partir de culturas tratadas com 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de FUDR. Coloração sólida com Giemsa 5%. Barra = 10 $\mu\text{m}$ .

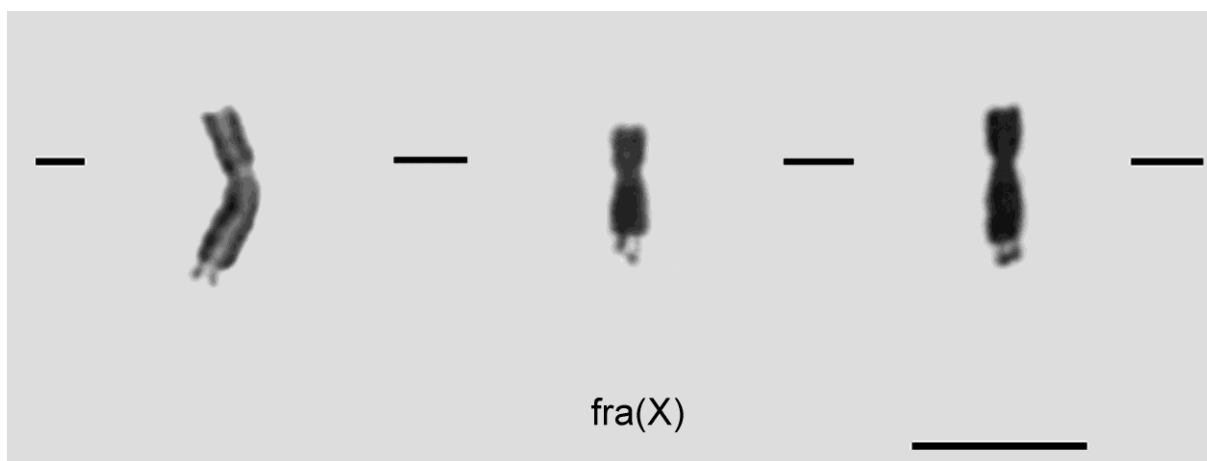


Figura 6 – Amostra de cromossomos fra(X) ampliados do irmão 2 obtidos a partir de culturas tratadas com 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de FUDR. Coloração sólida com Giemsa 5%. Barra = 10 $\mu\text{m}$ .

### 5.3 Expressão de fra(X)

Identificou-se a presença de FRAXA nos dois irmãos analisados apenas nas culturas tratadas com FUDR. A porcentagem de expressão foi de 21% no irmão 1 e 20% no irmão 2. Os resultados obtidos discriminando-se cada meio de cultura e tratamento com antagonista e suas respectivas porcentagens de expressão de fra(X) estão sumarizados na tabela 6.

Tabela 6 – Porcentagem de expressão de fra(X) nos diferentes meios de cultura utilizados em combinação com Mtx e FUdR.

Membro da família	Meio de cultura	Inibidor	Expressão de fra(X) (%)
Irmão 1	RPMI 1640 S	FUdR 0,25 µg/mL	12
		Mtx 8 µg/mL	0
	LymphoGrow	FUdR 0,25 µg/mL	27
		Mtx 8 µg/mL	0
	PB-MAX	FUdR 0,25 µg/mL	24
		Mtx 8 µg/mL	0
Irmão 2	RPMI 1640 S	FUdR 0,25 µg/mL	13
		Mtx 8 µg/mL	0
	LymphoGrow	FUdR 0,25 µg/mL	21
		Mtx 8 µg/mL	0
	PB-MAX	FUdR 0,25 µg/mL	26
		Mtx 8 µg/mL	0

#### 5.4 Heredograma

A figura 7 representa o padrão de herança da FXS na família dos dois irmãos analisados. No histórico familiar, não há outros casos de pessoas afetadas com diagnóstico de X frágil. Os pais (I-1 e I-2) e a irmã (II-2) são fenotipicamente normais e não foram analisados nesse estudo.

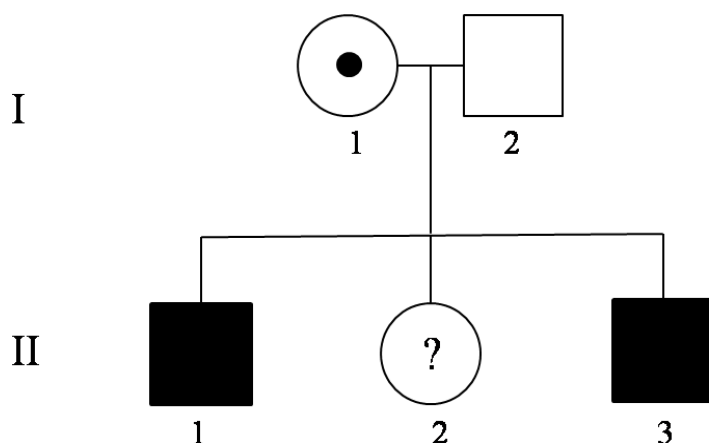


Figura 7 – Heredograma da família participante desse estudo. II-1 e II-3 apresentam cromossomo fra(X). A mãe (I-1) é portadora da pré-mutação. A filha (II-2) é normal, mas tem 50% de chance de também ser portadora, o que é indicado por um símbolo com interrogação. Os símbolos totalmente preenchidos em preto correspondem aos indivíduos afetados, enquanto o círculo com marcação central representa portador da pré-mutação.



## 6 DISCUSSÃO

Três diferentes meios de cultura foram utilizados para realização das análises: RPMI 1640 (Sigma<sup>®</sup>), LymphoGrow (Cytogen<sup>®</sup>) e PB-MAX (GIBCO<sup>®</sup>) em combinação ou não com FUdR ou Mtx. Uma redução no número de metáfases foi observada comparativamente às culturas sem adição de antagonista. O decréscimo foi mais acentuado para o tratamento com Mtx. FUdR e Mtx atuam inibindo a biosíntese de timidilato. Jacky (1997) salientou que se essa reação é inibida, mesmo que moderadamente, pode restringir a síntese de DNA, prejudicando assim a divisão celular. Nos tubos com FUdR a média de metáfases obtida foi semelhante. As culturas com RPMI 1640, LymphoGrow e PB-MAX apresentaram em média 19, 27 e 24 metáfases por lâmina, respectivamente, para o irmão 1; 20, 22 e 26 metáfases para o irmão 2. Os tubos em que foram acrescentados Mtx apresentaram número reduzido de metáfases e de linfócitos nas culturas de ambos os irmãos, independente de qual meio foi utilizado, provavelmente em virtude da maior toxicidade desse tratamento observada em nosso estudo. As médias obtidas nos ensaios com FUdR ou Mtx para cada irmão foram submetidas à análise de variância e o teste F não foi significativo a 5% de probabilidade. Desse modo, os linfócitos cultivados nos três meios responderam de forma equivalente à adição dos antagonistas.

Quanto à expressão, o sítio fra(X) foi evidente em 21% das metáfases no irmão 1 e em 20% no irmão 2. Esses dados estão de acordo com a estimativa de expressão em homens afetados que varia de 10-40% (RICHARDS e SUTHERLAND, 1992) e corroboram com os de outros estudos que reportaram que homens da mesma família tendem a apresentar frequências similares de fra(X). Tem sido proposto que a frequência de expressão pode ser uma característica familiar determinada geneticamente (SOUDEK *et al.*, 1984; HECHT *et al.*, 1986; BROWN *et al.*, 1987; JACKY, 1997).

A indução de fra(X) foi observada apenas nos tubos tratados com FUdR. O tratamento com Mtx foi tóxico para as células, pois além de poucas metáfases (número médio menor que 10 por lâmina), todas as culturas com esse tratamento também apresentaram poucos linfócitos. Esse resultado limita o estabelecimento inequívoco de conclusões sobre a eficiência de indução desse inibidor. Mtx e FUdR atuam em etapas diferentes da biosíntese de dNTP e ambos são utilizados eficientemente para elucidar FRAXA (JACKY, 1997). Jacky e Sutherland (1983) encontraram frequências de expressão do sítio frágil similares quando utilizados meios com baixas concentrações de ácido fólico ou meios convencionais com a adição de inibidores Mtx ou FUdR. Esses mesmos autores também salientaram que problemas similares de toxicidade têm sido encontrados quando se utiliza tanto inibidores de timidilato como de folato.

O sítio frágil foi identificado com maior nitidez nas metáfases com coloração sólida. O bandeamento G também foi realizado para confirmar a presença de fra(X) e distingui-lo de outros sítios frágeis constitutivos. Recomendamos que o *screening* inicial para prospecção de fra(X) seja feito em metáfases com coloração sólida. Jacky (1997) salienta que pode ocorrer um intumescimento da cromatina em resposta aos pré-tratamentos enzimáticos e de aquecimento durante o bandeamento, e que isso pode mascarar a expressão do sítio frágil.

A partir dos resultados da avaliação citogenética dos indivíduos afetados construiu-se um heredograma da família abrangendo duas gerações (figura 7). Os indivíduos fenotipicamente normais (pais I-1; I-2 e irmã II-2) não foram analisados nesse estudo, uma vez que a resolução da técnica não discrimina portadores da pré-mutação. O resultado positivo para expressão de fra(X) nos dois irmãos é sugestivo de que a mãe seja portadora da pré-mutação. Tem sido reportado que as primeiras mutações completas ocorrem na prole de mulheres portadoras da pré-mutação (YU *et al.*, 1992; SNOW *et al.*, 1993) e que a repetição CGG pode sofrer expansão apenas quando transmitida da mulher para seus descendentes (YU *et al.*, 1992; MALTER *et al.*, 1997; ROUSSEAU *et al.*, 2011). Segundo essa proposição, se a mãe (I-1) for portadora, a filha (II-2) tem 50% de ter herdado o alelo pré-mutado de sua mãe.

Em nosso estudo utilizamos ferramentas citogenéticas para identificação do sítio fra(X) associado à FXS. Contudo, desde a década de 90 com a clonagem do gene FMR1 (OBERLE *et al.*, 1991; VERKERK *et al.*, 1991; YU *et al.*, 1991) técnicas moleculares vêm sendo amplamente utilizadas para diagnóstico da FXS. Tanto que há uma escassez de trabalhos de pesquisa atuais com citogenética do X frágil. Nos procedimentos clássicos para prospecção de fra(X) as melhores metáfases eram selecionadas e fotografadas, a seguir o filme fotográfico era revelado e ampliado. Só então os cromossomos poderiam ser recortados manualmente e o cariótipo montado (VERMA e BABU, 1995; GERSEN e DOWNEY, 2005). Entretanto, nos últimos anos, com a evolução das ferramentas de análise de imagem e microscopia e com o advento das câmeras digitais, as análises citogenéticas, inclusive para prospecção de fra(X), tornaram-se mais acuradas. As metáfases focalizadas no microscópio podem ser visualizadas com aumento e resolução adequadas na tela do computador e analisadas em tempo real. Além disso, é possível a realização de ajustes de contraste e brilho nas imagens (GERSEN e DOWNEY, 2005) o que possibilita a identificação de alterações no cariótipo com mais clareza. Os sistemas automatizados também proporcionam a análise e o armazenamento de um número maior de imagens. Soma-se a isso a disponibilidade de *softwares* que linearizam e pareiam os cromossomos de maneira semi-interativa. Essas ferramentas fazem com que a citogenética se mantenha como uma metodologia diagnóstica aplicável nos dias atuais. Além disso, a análise

citogenética é o procedimento recomendado como ferramenta de *screening* inicial, com o objetivo de estabelecer possíveis causas para o atraso do desenvolvimento, tais como alterações cromossômicas numéricas e estruturais (GARDNER e SUTHERLAND, 2004; LENNOX, 2005) que não são detectáveis pelas técnicas moleculares para identificação de X frágil (WEBB, 1991).

Mahajan *et al.* (2011) salientaram que a citogenética é um método confiável para diagnóstico de alterações cromossômicas. Esses mesmos autores afirmaram que todos os casos de retardo mental devem ser avaliados citogeneticamente com cultura padrão de linfócitos e também em meio com baixas concentrações de ácido fólico para expressão de sítios frágeis.

Quanto ao diagnóstico citogenético da FXS, tem sido reportado que o rastreamento do cromossomo X frágil por essa técnica pode diagnosticar a síndrome em 99% dos homens afetados e em 90-95% das mulheres afetadas (TARLETON e SOUL, 1993; IQBAL *et al.*, 2000).

Estudos comparativos têm demonstrado que os achados citogenéticos são compatíveis com os determinados por técnicas moleculares. Hofstee *et al.* (1994), em um estudo de 434 indivíduos com retardo mental, concluíram que a identificação citogenética de fra(X) era correspondente aos ensaios de PCR e hibridização por *Southern blot* da repetição CGG. Rousseau *et al.* (1994) encontraram forte correlação entre os resultados obtidos por técnicas moleculares sobre *status* de metilação e tamanho da sequência CGG, com a análise citogenética, dismorfismo facial, macroorquidismo e retardo mental nos indivíduos que apresentavam a FXS. Esse estudo envolveu 2.253 pessoas com 693 indivíduos com mutação completa de 318 famílias diferentes com histórico de X frágil, a partir de 14 laboratórios de todo o mundo. Charles (2009) concluiu que as técnicas moleculares confirmaram os achados citogenéticos em um estudo com 659 indivíduos com retardo mental, em que os afetados apresentavam a amplificação de trinucleotídeos na ordem de mais de 200 repetições CGG na região do alelo X frágil. Assim, a análise citogenética continua a ser na atualidade uma ferramenta de *screening* confiável e reprodutível. Portanto, uma técnica adequada tanto para identificação de alterações numéricas e estruturais associadas às formas mais comuns de retardo mental e atraso de desenvolvimento, como para detecção de FRAXA em pacientes portadores da mutação completa de FMR1.

## **7 CONCLUSÕES**

Nesse estudo utilizaram-se dois antagonistas em combinação com três diferentes meios de cultura. Entretanto, observou-se a expressão de fra(X) apenas nas culturas tratadas com FUdR. O tratamento com Mtx resultou em número insuficiente de metáfases analisáveis, por isso não foi possível estabelecer conclusões a respeito da eficiência desse inibidor. Os procedimentos de indução de sítio frágil e análise citogenética mostraram-se adequados para identificar a presença de fra(X) nos dois indivíduos analisados com indicativo clínico de suspeita de X frágil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D et al. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study – preliminary data. *Am J Med Genet* 1999; 83: 322–5.

American College of Medical Genetics. *Standards and guidelines for clinical genetics laboratories*. Technical standards and guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories of the American College of Medical Genetics, 2006.

American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. ACOG Committee Opinion No. 469: Carrier screening for fragile X syndrome. *Obstet Gynecol* 2010; 116:1008.

Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL et al. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA repair (Amst)* 2006; 8: 1126–35.

Ashley CT, Wilkinson KD, Reines D et al. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 1993; 262: 563–66.

Barch MJ, Knutsen TK, Spurbeck JL editors. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Lippincott-Raven Press Ltd, 1997.

Bardoni B, Mandel JL, Fisch GS. FMRI gene and fragile X. *Am J Med Genet* 2000; 97: 153–63.

Bear MF, Huber KM, Warren ST. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Neuroscience* 2004; 27: 370–7.

Beirne-Smith M, Patton J, Ittenbach R. *Mental Retardation*. 4<sup>th</sup> ed. Sydney: Maxwell Macmillan International, 1994: 218–22.

Bhasin MK. Human Population Cytogenetics: A Review. *Int J Hum Genet* 2005; 5: 83–152.

Branda RF, Nelson NL. Effects of pH on 5-methyltetrahydrofolic acid transport in human erythrocytes. *Biochem Pharmacol* 1982; 31:2300-2.

Brown WT, Houck Jr. GE, Jeziorowska A et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using nonradioactive PCR test. *JAMA* 1993; 270: 1569–75.

Brown WT, Jenkins EC, Friedman E. Folic acid therapy in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1984; 17: 289–97.

Brown WT, Jenkins EC, Gross AC et al. Further evidence for genetic heterogeneity in the fragile X syndrome. *Hum Genet* 1987; 75: 311–21.

Butler MG, Mangrum T, Gupta R, Singh DN. A 15-item checklist for screening mentally retarded males for the fragile X syndrome. *Clin Genet* 1991; 39: 347–54.

Calva-Mercado M-P, Maunoury C, Rethoré M-O, Lejeune J. Fragilité de l' et inhibition de la dihydrofolate réductase: comparaison des effets de deux antibiotiques - triméthoprim et pyriméthamine. *Ann Génét* 1983; 26: 147–9.

Carvalho, A.A. Caracterização de pacientes com indicação clínica para cariótipo em um hospital de reabilitação (São Luís-MA). Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís-MA, 2006.

Charles AL. Fragile X allelemorphism among the mentally retarded and in affected families. *Sci Res Essays* 2009; 4: 1123–31.

Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002; 132: 2413–18.

Coffee B, Ikeda M, Budimirovic DB et al. Mosaic FMR1 deletion causes fragile X syndrome and can lead to molecular misdiagnosis: a case report and review of the literature. *Am J Med Genet* 2008; 146: 1358–67.

Coffee B, Zhang F, Ceman S et al. Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 923–32.

Crawford DC, Acuña JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* 2001; 3: 359.

Cronister A, Hagerman RJ, Wittenberger M, Amiri K. Mental impairment in cytogenetically positive fragile X females. *Am J Med Genet* 1991; 38: 503–4.

Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D et al. Evaluation of mental retardation: Recommendations of a consensus conference: American college of medical genetics. *Am J Med Genet* 1997; 72: 468–77.

Dave BJ, Sanger WG. Role of Cytogenetics and Molecular Cytogenetics in the Diagnosis of Genetic Imbalances. *Semin Pediatr Neurol* 2007; 14: 2–6.

de Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* 1993; 3: 31–5.

de Vries BB, Wiegers AM, Smits AP et al: Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1025–32.

Debacker K, Kooy RF. Fragile sites and human diseases. *Hum Mol Genet* 2007; 15: 150–8.

Devys D, Lutz Y, Rouyer N et al. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet* 1993; 4: 335–40.

Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet* 2007; 47: 169–92.

Eichler EE, Holden JJA, Popovich BW et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet* 1994; 8: 88–94.

- Erbe RW. Genetic aspects of folate metabolism. *Adv Hum Genet* 1979; 9: 293–354, 367–9.
- Félix TM. Sítios frágeis. In Maluf SW, Riegel M et al. *Citogenética Humana*. Porto Alegre: Artmed, 2011: 147–50.
- Fishburn J, Turner G, Daniel A, Brookwell R. The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohort of moderately retarded males with affected brothers. *Am J Med Genet* 1983; 14: 713–24.
- Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ et al. The detection of sub telomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 1995; 9: 132–40.
- Freund LS, Reiss AL, Abrams MT: Psychiatric disorders associated with fragile X in the young female. *Pediatrics* 1993; 91: 321–9.
- Fu JH, Kuhl DP, Pizzuti A et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67: 1047–58.
- Garber KB, Visootsak J, Warren ST. Fragile X Syndrome. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 666–72.
- Gardner RJM, Sutherland GR. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford University Press, 2004: 218–32.
- Gersen SL, Downey L. Instrumentation in the cytogenetics laboratory. In: Keagle MB, Gersen SL, editors. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. New York: Humana Press, 2005: 113–30.
- Glover TW. FUDR induction of the X-chromosome fragile site: Evidence of the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *Am J Hum Genet* 1981; 33: 234–42.
- Hagerman RJ, Silverman AC editors. *Fragile X syndrome diagnosis, treatment, and research*. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1996.
- Hagerman RJ, Van Housen K, Smith ACM. Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1984; 17: 111–21.
- Hansen RS, Canfield TK, Lamb MM et al. Association of fragile X syndrome with delayed replication of the *FMR1* gene. *Cell* 1993; 73: 1403–9.
- Hecht F, Fryns JP, Vlietinck RF, van den Berghe H. Genetic control over fragile X chromosome expression. *Clin Genet* 1986; 29: 191–95.
- Heitz D, Devys D, Imbert G et al. Inheritance of the Fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determination of the transition to full mutation. *J Med Genet* 1992; 29: 794–801.
- Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS et al. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet* 1993; 3: 36–43
- Hirst MC, Barnicoat A, Flynn G et al. The identification of a third fragile site, FRAXF, in Xq27-q28 distal to both FRAXA and FRAXE. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 197–200.

- Hofstee Y, Arinami T, Hamaguchi H. Comparison between the cytogenetic test for fragile X and the molecular analysis of the FMR-1 gene in Japanese mentally retarded individual. *Am J Med Genet* 1994; 51: 466–70.
- Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7746–50.
- Hubner RA, Houlston RS. Folate and colorectal cancer prevention. *Br J Cancer* 2009; 100: 233–9.
- Hussein, SM. Fragile x mental retardation and fragile x chromosomes in the Indonesian population. Thesis (Doctor of Philosophy) – Faculty of Medicine, University of New South Wales, Sydney, 1998.
- Iqbal MA, Sakati N, Nester M, Ozand P. Cytogenetic diagnosis of fragile X syndrome: study of 305 suspected cases in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med* 2000; 20: 214–7.
- Jacky PB. Cytogenetics. In Hagerman RJ, Cronister A editors. *Fragile X syndrome. Diagnosis, treatment and research* 2<sup>nd</sup> ed. Baltimore The John Hopkins University Press, 1996: 114–64.
- Jacky PB, Ahuja YR, Anyane-Yeboa K et al. Guidelines for the preparation and analysis of the fragile X chromosome in lymphocytes. *Am J Med Genet* 1991; 38: 400–3.
- Jacky PB. Fragile X and other heritable fragile sites on human chromosomes. In Barch MJ, Knutsen TK, Spurbeck JL editors. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New York: Lippincott-Raven Press Ltd, 1997: 527–56.
- Jacky PB, Sutherland GR. Thymidylate synthetase inhibitors and fragile site expression in lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 1276–83.
- Jacobs PA, Glover TW, Mayer M. X-linked mental retardation: a study of 7 families. *Am J Med Genet* 1980; 7: 471–89.
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey MA et al: Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a permutation carrier population. *JAMA* 2004; 291: 460–9.
- Jennings M, Hall JG, Hoehn H. Significance of phenotypic and chromosomal abnormalities in X-linked mental retardation (Martin-Bell or Renpenning syndrome). *Am J Med Genet* 1980; 7: 417–32.
- Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 901–8.
- Jones C, Penny L, Mattina T et al. Association of chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene CBL2. *Nature* 1995; 376: 145–9.
- Kang S, Ohshima K, Shimizu M et al. Pausing of DNA synthesis in vitro at specific loci in CTG and CGG triplet repeats from human hereditary disease genes. *J Biol Chem* 1995; 270: 27014–21.



- Keysor CS, Mazzocco MM. A developmental approach to understanding fragile X syndrome in females. *Microsc Res Techniq* 2002; 57: 179–86.
- Krumdieck CL, Howard-Peebles PN. On the nature of folic acid sensitive fragile sites in human chromosomes: an hypothesis. *Am J Med Gen* 1983; 16:23–8.
- Kunst CB, Warren ST. Cryptic and polar variation of the Fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* 1994; 77: 853.
- Kunz, BA. Inhibitors of thymine nucleotide biosynthesis: Antimetabolites that provoke genetic change via primary non-DNA targets. *Mutation Res* 1996; 355: 129–40.
- Laird C, Jaffe E, Karpen G et al. Fragile site in human chromosomes as regions of late replicating DNA. *Trends Genet* 1987; 3: 247–81.
- Lehrke R. Theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am J Ment Defic* 1972; 76: 611–9.
- Lennox N. Developmental Disability Steering Group . *Management guidelines: developmental disability*. Melbourne, Australia: Therapeutic Guidelines. Preventive health care and health promotion. Version 2. 2005.
- Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 1969; 21: 231–44.
- Macpherson JN, Nelson DL, Jacobs PA. Frequent small amplifications in the FMR-1 gene in fra(X) families: limits to the diagnosis of 'premutations'. *J Med Genet* 1992; 29: 802–6.
- Macpherson JN, Sawyer H. Practice Guidelines for molecular diagnosis of Fragile X Syndrome. Clinical Molecular Genetics Society (CMGS) workshop, 2005. Disponível em: <<http://www.cmgs.org/BPGs/pdfs>> Acesso em: 19/04/2012.
- Maddalena A, Richards CS, McGinniss MJ et al. Technical Standards and Guidelines for Fragile X: The First of a Series of Disease-Specific Supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee. *Genet Med* 2001; 3: 200–5.
- Mahajan S, Kaur A, Singh JR. Cytogenetic Investigations in Mentally Challenged Individuals. *Int J Hum Genet* 2011; 11: 93–8.
- Malter HE, Iber JC, Willemsen R et al. Characterization of the full fragile X mutation in fetal gametes. *Nat Genet* 1997; 15:165–9.
- Maluf SW, Riegel M et al. *Citogenética Humana*. Porto Alegre: Artmed, 2011. 336 p.
- Martin J P, Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiatry* 1943; 6: 154-7.
- Mattei MG, Mattei JF, Vidal I, Giraud F. Expression in lymphocyte and fibroblast culture of the fragile X chromosome: a new technical approach. *Hum Genet* 1981; 59: 166–9.

- McConkie-Rosell A, Abrams L, Finucane B et al: Recommendations from multi-disciplinary focus groups on cascade testing and genetic counseling for fragile X-associated disorders. *J Genet Couns* 2007; 16: 593–606.
- McConkie-Rosell A, Finucane B, Cronister A et al. Genetic counseling for Fragile X Syndrome: updated recommendations of the national society of genetic counselors. *J Genet Couns* 2005; 14: 249–70.
- Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP et al. RNAcargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. *Neuron* 2003; 37: 417–31.
- Morton NE, Macpherson JN. Population genetics of the fragile-X syndrome: multiallelic model for the FMR1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4215–7.
- Mulley JC, Sutherland GR. Fragile x transmission and the determination of carrier probabilities for genetic counseling. *Am J Med Genet* 1987; 26: 987–90.
- Nielsen KB, Tommerup N. Cytogenetic investigations in mentally retarded and normal males from 14 families with the fragile site at Xq28. Results of folic acid treatment on fra(X) expression. *Hum Genet* 1984; 66: 225–9.
- Nielsen KB, Tommerup N, Poulsen H. Carrier detection and X-inactivation studies in the fragile X syndrome. Cytogenetic studies in 63 obligate and potential carriers of the fragile X. *Hum Genet* 1983; 64: 240–5.
- Nolin SL, Brown WT, Glicksman A et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 454–64.
- Nolin SL, Lewis FA, Ye LL et al. Familial transmission of the FMR-1 CGG repeat. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 1252–61.
- Nussbaum RL, Ledbetter DH. Fragile X syndrome: a unique mutation in man. *Ann Rev Genet* 1986; 20:109–45.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragileXsyndrome. *Science*1991; 252: 1097–102.
- Ozeri-Galai E, Bester AC, Kerem B. The complex basis underlying common fragile site instability in cancer. *Trends Genet* 2012; 28: 295–302.
- Pandey UB, Phadke SR, Mittal B. Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile X mental retardation. *Neurol India* 2004; 52: 36–42.
- Paris Conference (1971) Supplement (1975). Standardization in human cytogenetics: Birth Defects: Original Article Series. The National Foundation, New York 1975; 11(9). Also in *Cytogenet Cell Genet*, 15: 201–238.
- Pieretti M, Zhang F, Fu YH et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 66: 817–22.

Reidy JA. Folate and deoxyuridine-sensitive chromatid breakage may result from DNA repair during G2. *Mutation Res* 1987; 192: 217–9.

Reidy JA. Role of deoxyuridine incorporation and DNA repair in the expression of human chromosomal fragile sites. *Mutation Res* 1988; 200: 215–20.

Richards BW, Sylvester PE, Brooker C. Fragile X-linked mental retardation: the Martin-Bell syndrome. *J Ment Defic Res* 1981; 25: 253–6.

Richards RI, Sutherland GR. Fragile X syndrome: The molecular picture comes into focus. *Trends Genet* 1992; 8: 249–55.

Rosenberg C, Vianna-Morgante AM, Otto PA, Navajas L. Effect of X inactivation on fragile x frequency and mental retardation. *Am J Med Genet* 1991; 38: 421–4.

Rousseau F, Heitz D, Biancalana V et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991; 325: 1673–81.

Rousseau F, Heitz D, Tarleton J et al. A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: The first 2,253 cases. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 225–37

Rousseau F, Labelle Y, Bussi eres J, Lindsay C. The Fragile X Mental Retardation Syndrome 20 Years After the FMR1 Gene Discovery: an Expanding Universe of Knowledge. *Clin Biochem Rev* 2011; 32: 135–62.

Santoro MR, Bray SM, Warren ST: Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2012; 7: 219–45.

Saunders K, Czepulkowski B. Culture of human cells for chromosomal analysis. In Czepulkowski B editor. *Analyzing chromosomes*. New York: Springer-Verlag, 2001:19–48.

Shapiro LR, Wilmot PL, Murphy PD, Breg WR. Experience with multiple approaches to the prenatal diagnosis of the fragile X syndrome: Amniotic fluid, chorionic villi, fetal blood and molecular methods. *Am J Med Genet* 1988; 30: 347–54.

Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985; 69: 289–99.

Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: Diagnostic and carrier testing. *Genet Med* 2005; 7:584–7.

Snow K, Doud LK, Hagerman R et al. Analysis of the CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 1217–28.

Soudek D, Partington MW, Lawson JS. The fragile X syndrome I: Familial variation in the proportion of lymphocytes with the fragile site in males. *Am J Hum Genet* 1984; 17: 241–52.

Sumner AT. Chromosome banding and identification absorption staining. In: Gosden JR editor. *Methods in molecular biology*. Totowa: Humana press, 1994; 29: 59–81.

Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F et al. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 397–400.

Sutherland GR, Baker E. Characterization of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 111–3.

Sutherland GR, Ledbetter DH. Report of the committee on cytogenetic markers. Human Gene mapping 9.5. Update to the Ninth International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet Cell genet* 1988; 46: 221–3.

Sutherland GR, Mulley JC. Fragile X syndrome and other causes of X-linked handicap. In Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE editors. *Principles and Practice of Medical Genetics* 3<sup>rd</sup> ed. New York: Churchill Livingstone, 1997: 1745–66.

Sutherland GR. Fragile site on human chromosomes: Demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 1977; 197: 265–6.

Sutherland GR. Heritable fragile sites on human chromosomes I: Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am J Hum Genet* 1979; 31: 125–35.

Sutherland GR. The role of nucleotides in human fragile site expression. *Mutation Res* 1988; 200: 207–13.

Sutherland GR. Chromosomal fragile sites. *Genet Anal Tech* 1991; 8: 161–6.

Tarleton JC, Soul RA. Molecular genetic advances in fragile X syndrome. *J Pediatr* 1993; 122: 169–85.

Terracciano A, Pomponi MG, Marino GM et al. Expansion to full mutation of a FMR1 intermediate allele over two generations. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 333–6.

Thapar A, Gottesman II, Owen MJ et al. The Genetics of Mental Retardation. *British J Psy* 1994; 164: 747–58.

Tommerup N, Poulsen H, Brøndum-Nielsen K. 5-Fluoro-2'-deoxyuridine induction of the fragile site on Xq28 associated with X linked mental retardation. *J Med Genet* 1981; 18: 374–8.

Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64:196–7.

Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905–14.

Verma RS, Babu A. *Human chromosomes: principles and techniques* 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw Hill, 1995. 419p.

Vianna-Morgante AM, Costa SS, Pavanello RCM et al. Premature ovarian failure (POF) in Brazilian fragile X carriers. *Genet Mol Biol* 1999; 22: 471–4.

Warren ST, Nelson DL. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. *JAMA* 1994; 271: 536–42.

Webb T. Delayed replication of Xq27 in individuals with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1992; 43: 1057–62.

Webb T. Molecular genetics of fragile X: a cytogenetics viewpoint. Report of the Fifth International Symposium on X Linked Mental Retardation, Strasbourg, France, 12 to 16 August 1991. *J Med Genet* 1991; 28: 814–7.

Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL et al. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril* 2007; 87: 456–65.

Wohrle D, Hennig I, Vogel W, Steinbach P. Mitotic stability of fragile X mutations in differentiated cells indicates early post-conceptual trinucleotide repeat expansion. *Nat Genet* 1993; 4: 140–2.

World Health Organization (WHO). *Genes and human disease*. Disponível em: <<http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases>> Acesso em: 05/01/2012.

Yu S, Mulley J, Loesch D et al. Fragile X syndrome: unique genetics of the heritable unstable element. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 968–80.

Yu S, Pritchard M, Kremer E et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991; 252: 1179–81.

Yu W, Wenger SL, Steele MW. X chromosome imprinting in fragile x syndrome. *Hum Genet* 1990; 85: 590–4.

ANEXO A – Registro do projeto de pesquisa desenvolvido

**DADOS DO PROJETO: USO DE FERRAMENTAS CITOGENÉTICAS ASSOCIADAS À ANÁLISE DE IMAGEM VISANDO ESCLARECIMENTO DE SÍNDROMES CROMOSSÔMICAS DE NATUREZA ESTRUTURAL**

---

<b>Número de Registro:</b>	20217261914
<b>Data de Registro:</b>	18/01/2012
<b>Revisão:</b>	Não
<b>Modalidade do Projeto:</b>	Projeto Autônomo
<b>Projeto Relacionado a Treinamento?</b>	Sim
<b>Modalidade do Projeto Relacionado a Treinamento:</b>	Mestrado
<b>Título do Projeto:</b>	Uso de ferramentas citogenéticas associadas à análise de imagem visando esclarecimento de síndromes cromossômicas de natureza estrutural
<b>Palavras Chaves:</b>	Citogenética; análise de imagem; cromossomos; bandeamento; antagonistas
<b>Grupo de Pesquisado CNPq Certificado pela UFV:</b>	Citogenética e citometria de genomas
<b>Área de Conhecimento (CNPq):</b>	Ciências Biológicas - Genética - Genética Humana e Médica
<b>Linha de Pesquisa:</b>	Citogenética e Citometria de Fluxo e de Imagem

Formulário completo disponível em: <http://www.ufv.br/sisppg/.../verProjeto.php>



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA E CITOMETRIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_ e \_\_\_\_\_ autorizamos, como responsáveis legais de \_\_\_\_\_, a sua participação na pesquisa “Análises citogenética e citométrica de eventuais alterações cromossômicas”. Entendo que uma amostra de sangue será coletada com o uso de material descartável e de acordo com as normas de segurança e Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Esse procedimento não oferece riscos à saúde e uma outra coleta poderá ser solicitada caso necessário. O material coletado será utilizado para estabelecimento de cultura de linfócitos, a partir dos quais serão realizadas as análises com o propósito de determinar se o participante é portador de uma alteração citogenética. Um resultado normal dessa análise indica apenas normalidade citogenética do participante, não se excluindo outras alterações gênicas ou mesmo citogenéticas como microdeleções, microduplicações ou rearranjos complexos que requerem técnicas de biologia molecular para sua identificação.

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Ao participar desta pesquisa os envolvidos não terão benefícios financeiros bem como não serão onerados. Após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que a participação é voluntária. Confirmando que recebi cópia deste termo, e autorizo que o material coletado possa ser utilizado na execução da presente pesquisa, assim como a divulgação dos resultados obtidos nesse estudo em veículos de divulgação científica, resguardando-se o sigilo e a identidade dos participantes e dos responsáveis.

Viçosa, de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_ CI: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Telefone para contato: \_\_\_\_\_

Assinatura dos responsáveis:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Coordenador do projeto: \_\_\_\_\_